



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
FOTOPROTECTORA IN-VITRO DEL COMPONENTE
FLAVÓNICO PRESENTE EN *Bidens andicola* (ÑACHAG)”**

**TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTOR: MAYRA DANIELA TINAJERO ROBALINO
TUTOR: BQF. FAUSTO CONTERO**

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuerza y darme la guía y sabiduría para tomar las decisiones correctas en mi vida.

A mis padres y hermano, quienes han sido mi compañía y mi luz durante toda mi vida estudiantil.

A mi amado prometido quien ha sido mi inspiración y mi apoyo incondicional en cada etapa de mi existir.

Y a todos mis seres queridos y amigos, quienes me brindaron un soporte total para concluir mi trabajo final de grado.

Mayra Tinajero R.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser ente institucional de sabiduría y formación profesional.

A mis padres Freddy Tinajero y Martha Robalino, mi hermano Esteban, mis abuelos y a toda mi familia quienes son y serán mi aliento para salir adelante y cumplir mis metas.

Al BQF Fausto Contero, Lcda. Karen Acosta y Dra. Susana Abdo, en calidad de director y colaboradores durante el desarrollo de mi tesis por su ardua y valiosa contribución en la realización de la presente investigación.

Y en especial al amor de mi vida Carlitos Pazmiño, persona que con su gran corazón y generosidad me brinda todos los días la fuerza, el conocimiento y me guía para ser juntos un dúo de éxito.

Mayra Tinajero R.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación “**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA IN-VITRO DEL COMPONENTE FLAVÓNICO PRESENTE EN *Bidens andicola* (ÑACHAG)**” de responsabilidad del(a) señor(ita) egresado(a) Mayra Daniela Tinajero Robalino ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANA FAC. DE CIENCIAS	_____	_____
Dra. Ana Karina Albuja DIRECTORA DE ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	_____	_____
BqF. Fausto Contero DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Lcda. Karen Acosta MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Abg. Bertha Quintanilla COORDINADORA SISBIB-ESPOCH	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo Mayra Daniela Tinajero Robalino, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAYRA DANIELA TINAJERO ROBALINO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii

INTRODUCCIÓN	- 1 -
1 MARCO TEÓRICO	- 4 -
1.1 Radiación Ultravioleta	- 4 -
1.2 Índice Ultravioleta (UVI).....	- 5 -
1.3 Efectos Biológicos de la Radiación UV-A y UV-B.....	- 5 -
1.3.1 <i>Pigmentación de la Piel</i>	- 6 -
1.3.2 <i>Estimulación de la Queratogénesis</i>	- 7 -
1.3.3 <i>Fotoenvejecimiento Prematuro</i>	- 7 -
1.3.4 <i>Fotoalergenicidad</i>	- 7 -
1.3.5 <i>Cáncer De Piel</i>	- 7 -
1.4 Fotoprotección	- 8 -
1.4.1 <i>Factor de Protección Solar</i>	- 9 -
1.4.2 <i>Fotoprotectores tópicos</i>	- 9 -
1.4.3 <i>Tipos de fotoprotectores</i>	- 10 -
1.4.4 <i>Fotoprotectores naturales</i>	- 10 -
1.5 <i>Bidens andicola Kunth</i>	- 12 -
1.5.1 <i>Clasificación científica</i>	- 12 -
1.5.2 <i>Características botánicas</i>	- 13 -
1.5.3 <i>Uso medicinal</i>	- 13 -

1.5.4	<i>Ecología y ubicación geográfica en Ecuador</i>	- 13 -
1.5.5	<i>Composición y principios activos</i>	- 13 -
2	PARTE EXPERIMENTAL	- 14 -
2.1	Lugar de la investigación	- 14 -
2.2	Materiales, equipos y reactivos	- 14 -
2.2.1	<i>Material vegetal</i>	- 14 -
2.2.2	<i>Reactivos</i>	- 14 -
2.2.3	<i>Equipos e instrumentos</i>	- 15 -
2.3	Métodos y técnicas	- 16 -
2.3.1	<i>Recolección e identificación del material vegetal</i>	- 16 -
2.3.2	<i>Determinación del Contenido de Humedad</i>	- 16 -
2.3.3	<i>Determinación de Sólidos Totales</i>	- 17 -
2.4	Tamizaje Fitoquímico	- 17 -
2.4.1	<i>Extracción y aislamiento del componente flavónico</i>	- 18 -
2.4.2	<i>Aislamiento y Caracterización Fitoquímica del Marcador Flavónico</i>	- 18 -
2.4.3	<i>Evaluación de la actividad fotoprotectora in-vitro</i>	- 19 -
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 22 -
3.1	Determinación del Contenido de Humedad	- 22 -
3.2	Determinación de Sólidos Totales	- 22 -
3.3	Tamizaje Fitoquímico	- 23 -
3.4	Determinación de Requisitos Organoléptico.	- 24 -
3.5	Extracción y aislamiento del componente flavónico	- 24 -
3.5.1	<i>Extracción del componente flavónico</i>	- 24 -
3.5.2	<i>Rendimiento de Extracción</i>	- 25 -
3.5.3	<i>Estudio Cromatográfico</i>	- 25 -
3.5.4	<i>Análisis Cromatográfico para la determinación de Clorofilas y Carotenoides</i> ..	- 28 -
3.5.5	<i>Pruebas colorimétricas para flavonoides</i>	- 28 -

3.5.6	<i>Análisis por Espectroscopía Ultravioleta-visible para cada compuesto</i>	- 29 -
3.5.7	<i>Caracterización del esqueleto flavónico del marcador fitoquímico</i>	- 30 -
3.5.8	<i>Estandarización del Marcador Fitoquímico</i>	- 37 -
3.5.9	<i>Evaluación del Efecto protector UV-A inducida por muerte celular</i>	- 38 -
3.5.10	<i>Evaluación de la citotoxicidad en Artemia salina</i>	- 41 -
CONCLUSIONES		- 43 -
RECOMENDACIONES		- 44 -
BIBLIOGRAFÍA		- 45 -
ANEXOS		- 52 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
nm	Nanómetros
cm	Centímetros
Abs	Absorbancia
%H	Porcentaje de humedad
%SS	Porcentaje de Sólidos Totales
CYTED	Programa Iberoamericano De Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
FPS	Factor de Protección Solar
C	Concentración
UVI	Índice de Radiación Ultravioleta
UV	Ultravioleta
FE	Fase Estacionaria
MF	Marcador Fitoquímico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
IR	Infrarrojo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMM	Organización Meteorológica Mundial
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
IARC	Centro internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
SOLCA	Sociedad de Lucha Contra el Cáncer
EROS	Especies reactivas de oxígeno
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
COLIPA	Asociación europea Cosmética del Cuidado Personal
TLC	Cromatografía en Capa Fina

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Clasificación de FPS según COLIPA.....	-9-
Tabla 2-1.	Descripción botánica de <i>Bidens andicola</i> Kunth.....	-12-
Tabla 1-2.	Grupos de estudio para el estudio del efecto protector contra la radiación ultravioleta UV-A inducida por muerte celular.....	-19-
Tabla 2-2.	Factores y variables de respuesta para la evaluación de la citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	-21-
Tabla 3-2.	Clasificación de toxicidad según CYTED.....	-21-
Tabla 1-3.	Determinación del porcentaje de humedad de la droga seca de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag).....	-22-
Tabla 2-3.	Sólidos totales del subextracto acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag).....	-22-
Tabla 3-3.	Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag).....	-23-
Tabla 4-3.	Parámetros organolépticos del subextracto acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag).....	-24-
Tabla 5-3.	Constantes dieléctricas de solventes y mezclas azeotrópicas para la extracción del componente flavónico de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag).....	-24-
Tabla 6-3.	Rendimiento de Extracción Fitoquímica de <i>Bidens andicola</i>	-25-
Tabla 7-3.	Rf de compuestos encontrados en el subextracto acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> con FE: sílica gel 60F254; FM: cloroformo: acetato de etilo: metanol (5,8: 2,7: 2,2), Revelador: de luz fluorescente UV-A 365nm y sulfato de cerio. *Compuestos fluorescentes., **Marcador fitoquímico elegido.....	-27-
Tabla 8-3.	Rf de compuestos encontrados en el subextracto acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> con FE: sílica gel 60F254; FM: diclorometano: acetato de etilo: metanol (4:1:0,5), revelador: de luz fluorescente UV-A 365nm.*Compuestos fluorescentes.....	-28-
Tabla 9-3.	Resultados de las pruebas colorimétricas con, Shinoda para los compuestos del subextracto de acetato de etilo. * Marcador Fitoquímico.....	-29-
Tabla 10-3.	Bandas características para flavonoides.....	-30-
Tabla 11-3.	Absorbancia a 379nm del estándar flavónico de <i>Bidens andicola</i>	-38-
Tabla 12-3.	Grupos de estudio para el estudio del efecto protector contra la radiación ultravioleta UV-B inducida por muerte celular.....	-39-
Tabla 13-3.	Cálculo del FPS para el subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i>	-40-
Tabla 14-3.	Cálculo del FPS del marcador flavónico aislado de <i>Bidens andicola</i>	-40-

Tabla 15-3.	Cálculo de la toxicidad en <i>Artemia salina</i> - Subextracto de acetato de etilo.....	-41-
Tabla 16-3.	Cálculo de la toxicidad en <i>Artemia salina</i> - Marcador flavónico.....	-42-

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Estructura Básica de los Flavonoides.....	-12-
Figura 1-3.	Cromatografía en silica gel 60 F254 de 2 x 10 cm, de los subextractos obtenidos a partir de <i>B.andicola</i>	-26-
Figura 2-3.	Identificación del marcador fitoquímico, comparación entre subextracto en acetato de etilo y estándar de quercetina.....	-27-
Figura 3-3.	Ensayo colorimétrico de Shinoda para la identificación del componente flavónico de cada compuesto aislado del subextracto en acetato de etilo. De izquierda a derecha los compuestos: 1 al 8.....	-29-
Figura 4-3.	Placa preparativa de silica gel, utilizada para el aislamiento cuantitativo del marcador fitoquímico.....	-31-
Figura 5-3.	Análisis espectrofotométrico UV del compuesto flavónico Rf=0,11 del subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm en metanol.....	-32-
Figura 6-3.	Análisis espectrofotométrico UV del compuesto flavónico Rf=0,11 del subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm en metanol con AlCl ₃ sin HCl.....	-33-
Figura 7-3.	Análisis espectrofotométrico UV del compuesto flavónico Rf=0,11 del subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm en metanol con AlCl ₃ con HCl.....	-34-
Figura 8-3.	Análisis espectrofotométrico UV del compuesto flavónico Rf=0,11 del subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm con metóxido de sodio.....	-35-
Figura 9-3.	Análisis espectrofotométrico UV del compuesto flavónico Rf=0,11 del subextracto de acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm con metóxido de sodio.....	-36-
Figura 10-3.	Espectro IR, del marcador fitoquímico, donde se evidencia la presencia de los picos característicos a grupos funcionales tanto en vibración como en tensión de sus enlaces.....	-37-
Figura 11-3.	Curva de Calibración del Marcador Fitoquímico.....	-38-
Figura 12-3.	Gráfica de ANOVA-HSD TUKEY al 95% de confianza estadística para el ensayo de cito-protección sobre <i>E.coli</i>	-39-

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.	<i>Bidens andicola</i> Kunth.....	-12-
Fotografía 2.	Sistema de extracción de metabolitos por Soxhlet.....	-69-
Fotografía 3.	Embudo de separación con muestra de acetato de etilo.....	-69-
Fotografía 4.	Prueba colorimétrica de Shinoda para flavonoides.....	-70-
Fotografía 5.	Subextracto en acetato de etilo.....	-70-
Fotografía 6.	Análisis espectroscópico infrarrojo.....	-71-
Fotografía 7.	Extracción del marcador fitoquímico.....	-71-
Fotografía 8.	Marcador fitoquímico flavónico.....	-72-
Fotografía 9.	Análisis espectroscopía UV-Visible.....	-72-
Fotografía 10.	Preparación de medios de cultivo.....	-73-
Fotografía 11.	Análisis microbiológico del efecto citofotoprotector en <i>E. coli</i>	-73-
Fotografía 12.	Preparación de agua mar para el cálculo de la toxicidad en <i>Artemia salina</i>	-74-
Fotografía 13.	Eclosión de <i>Artemia salina</i>	-74-

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto hexánico de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-52-
ANEXO 2.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto etéreo <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-53-
ANEXO 3.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto en acetato de etilo de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-54-
ANEXO 4.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto en mezcla azeotrópica de acetato de etilo- etanol (60-40) de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-55-
ANEXO 5.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto en mezcla azeotrópica de éter-etanol (60-40) de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-56-
ANEXO 6.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto etanólico de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-57-
ANEXO 7.	Análisis espectrofotométrico UV- subextracto metanólico de <i>Bidens andicola</i> (Ñachag) a 100ppm.....	-58-
ANEXO 8.	Compuesto 1	-59-
ANEXO 9.	Compuesto 2	-60-
ANEXO 10.	Compuesto 3	-61-
ANEXO 11.	Compuesto 4	-62-
ANEXO 12.	Compuesto 5	-63-
ANEXO 13.	Compuesto 6	-64-
ANEXO 14.	Compuesto 7	-65-
ANEXO 15.	Compuesto 8	-66-
ANEXO 16.	Análisis estadístico Anova-Tukey. citoprotección	-67-
ANEXO 17.	Análisis estadístico T-student para muestras dependientes, factor de protección solar	-68-
ANEXO 18.	Evidencia Fotográfica, Trabajo de Investigación	-69-

RESUMEN

Se efectuó el estudio fitoquímico y evaluación de la actividad fotoprotectora in-vitro del componente flavónico presente en *Bidens andicola* (Ñachag), desarrollado en los laboratorios de Productos Naturales y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, con la finalidad de comprobar si los metabolitos flavónicos pueden aplicarse para prevenir efectos negativos por exposiciones prolongadas a la luz solar como fotoenvejecimiento prematuro, afecciones oculares, eritema y carcinoma dérmico. Se recolectó una muestra de la especie vegetal *Bidens andicola* (Ñachag), en la parroquia de Izamba, provincia de Tungurahua. Posteriormente se realizó el estudio fitoquímico mediante el análisis organoléptico, tamizaje y extracción de la fracción flavónica en solventes con distintas polaridades. De estudios anteriormente ejecutados la planta *Bidens andicola* (Ñachag) presenta flavonoides con estructura correspondiente a derivados de la quercetina, por lo que se comparó frente a un estándar cualitativa y cuantitativamente mediante espectrofotometría ultravioleta (UV-Vis) e infrarrojo (IR). Posteriormente se efectuó la evaluación de la actividad fotoprotectora in-vitro utilizando el método de muerte celular inducida por radiación UV-A en una cepa pura de *Escherichia coli*. Se determinó el factor de protección solar mediante la ecuación de Mansur y la concentración letal media (CL₅₀) del componente flavónico. En el tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de compuestos grasos, flavonoides, taninos y antocianidinas. Se obtuvo la mejor extracción del componente flavónico en acetato de etilo. En comparación con el estándar de quercetina existen compuestos correspondientes al metabolito en una concentración del 0,67%. En la evaluación de la actividad fotoprotectora in-vitro se determinó que el componente flavónico extraído en acetato de etilo a una concentración de 100ppm presenta una actividad de citoprotección efectiva frente a la radiación UV-A. El componente flavónico a 100ppm presenta un factor de protección solar de 20 y la concentración letal media CL₅₀ es de 204,48ppm. Por lo tanto se concluye que el componente flavónico de *Bidens andicola* (Ñachag) es un potencial agente fotoprotector in-vitro y se recomienda efectuar los estudios in-vivo para incluirlo en formulaciones de productos cosmeceúticos a nivel industrial a base de componentes naturales para la prevención del cáncer de piel y otras afecciones cutáneas por exposición a la radiación solar.

SUMMARY

Was made a phytochemical study and the evaluation of the photoresist in-vitro activity of flavone component in *Bidens andicola* (Ñachag), developed in Natural products and Microbiology Laboratories, of the Science Faculty of the Polytechnic School of Chimborazo in order to check whether the flavone metabolites can be applied to prevent negative effects by prolonged exposures to the sunlight as premature photoaging, eye disease, erythema and dermal carcinoma. A sample of the plant species was collected *Bidens andicola* (Ñachag) in Izamba Town, Tungurahua Province. After the phytochemical study was conducted by organoleptic analysis, screening and removal of the fraction flavonic solvent with different polarities. From previously studies from *Bidens andicola* (Ñachag) plant presents flavonoids with structure corresponding to derivatives of quercetin, which was compared to a standard qualitative and quantitatively by UV spectrophotometry (UV-Vis) and infrared (IR). Then, an evaluation of photoprotective activity was performed in- vitro using the method of cell death induced by UV-A radiation in a pure strain of *Escherichia coli*. The sun protection factor was determined by the equation of Mansur and the median lethal concentration (CL50) of flavonic component. In the presence of phytochemical screening was the presence of fatty compounds, flavonoids, tannins and anthocyanins. Was obtained the best extraction flavone in ethyl acetate. Compared with standard of quercetin there are compounds corresponding to the metabolite in a concentration of 0.67%. The evaluation of the activity photoresist in-vitro was determined that the flavone component extracted in ethyl acetate at a concentration of 100ppm has an effective activity of cytoprotection against UV-A radiation. The component flavone 100ppm has a sun protection factor of 20 and the median lethal concentration (CL50) is 204,48ppm. Therefore it is concluded that the flavone component *Bidens andicola* (Ñachag) is a potencial agent photoresist in-vitro and is recommended effect the in-vivo studies for inclusion in formulations cosmeceuticals products to industrially level bases on natural ingredients for the prevention of skin cancer and other skin conditions from exposure to sunlight.

INTRODUCCIÓN

El impacto de la radiación solar sobre la superficie terrestre ha alcanzado mayor intensidad en los últimos años debido a la disminución de la capa de ozono en la atmósfera superior. Dentro de la emisión solar aproximadamente el 50% corresponde a la luz visible con un rango de longitud de onda de 400-800nm, el 40% a la radiación infrarroja (IR) que va de 1300 a 1700nm y el tipo de radiación que se considera la más perjudicial para la piel es la ultravioleta UV que constituye el 10% y va de 10 a 400nm. La radiación UV se divide convencionalmente en UV-A (315-400nm) con una longitud de onda larga, UV-B (280-315nm) con su longitud de onda media y UV-C (100 a 280nm) con longitud de onda corta (Avila, J., et al. 2005, p301).

La intensidad de la radiación UV depende de factores como la altura del sol, latitud, nubosidad, altitud, la densidad de la capa de ozono y el índice de reflexión del suelo. Debido a esto, uno de los parámetros para indicar la medida de intensidad de la radiación solar sobre la superficie de la Tierra, es el Índice UV solar mundial (IUV), el mismo que se expresa en una escala de tolerabilidad de 0 a 11. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Meteorológica Mundial (OMM) un valor de IUV mayor a 5 nos indica que la población expuesta a dicha radiación, tiene una mayor probabilidad de sufrir lesiones cutáneas y oculares. Igualmente la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) en su informe HIPERIÓN del 22 de octubre de 2008, informó que los niveles de radiación detectados por las estaciones en tierra y confirmadas por las imágenes de los satélites superan los 14 IUV para Guayaquil y los 24 IUV para Quito. Es por eso que la ubicación geográfica de nuestro país al pasar por la zona ecuatorial constituye uno de los factores predominantes involucrados sobre el IUV que afecta a la población, lo cual nos alerta sobre el potencial daño al cual estamos expuestos los ecuatorianos. (OMS, 2003,p 2)

La radiación ultravioleta es capaz de inducir muchos efectos negativos dependiendo de la intensidad de exposición, así la radiación UV-B puede ser genotóxica debido a que causa daño a nivel de DNA celular, incrementando el estrés oxidativo e induciendo inflamación e inmunosupresión. Además la exposición prolongada a la radiación UV-A,

está relacionada a daño oxidativo celular, alteraciones a nivel de tejido conectivo dérmico (elastosis) y engrosamiento del estrato córneo y epidérmico de la piel (WLASCHEK, M., et al. 2001, p 45). Es por ello que estos factores están involucrados en procesos de fotoenvejecimiento, fotoalergenicidad, inducción de enfermedades oculares tales como cataratas y finalmente en varias etapas de la carcinogénesis dérmica. (WALLS, A., et al. 2013, p 1000)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), cada año, se producen en todo el mundo entre dos y tres millones de casos de cáncer de piel no melanocítico y aproximadamente ciento treinta mil casos de cáncer de piel melanocítico, debidos principalmente a la exposición prematura y crónica a la radiación solar UV-A y UV-B (FERREIRA, T. 2012, p135). En Ecuador, el Registro Nacional de Tumores, y la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA), constatan que 38,2% de todos los cánceres diagnosticados constituyen a melanoma de piel. El cual tiene una mayor prevalencia en hombres que en mujeres, siendo la edad y el tipo de piel otro factor predeterminante para su desarrollo (SOLCA, 2005).

Debido a las afecciones a nivel dérmico que puede producirse por la exposición prolongada a la radiación solar es necesario tomar medidas de protección, como el uso de filtros solares que contienen sustancias químicas capaces de prevenir los efectos adversos de la energía solar y, en particular, la radiación UV-A y UV-B (ELMETS, C., et al. 2001, p 426).

Es por esto que para suplementar el arsenal antioxidante y fotoprotector natural de la piel, el uso de metabolitos secundarios del grupo polifenólico extraído de vegetales que crecen en la zona ecuatorial a elevadas alturas, se considera como un potencial agente fitocosmecéutico en la protección solar, ya que son producidos por las plantas como mecanismo de defensa contra la elevada radiación UV-A y UV-B a la que están expuestas (AFAQ, F. 2011, p 145).

Además estudios recientes han demostrado que metabolitos de naturaleza fenólica como lo son los ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas, proantocianidinas y estilbenos, tienen actividades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, anticarcinogénicas, antioxidantes y fotoprotectoras (BISSETT, D., et al. 1991, p 323). Debido principalmente a su estructura policromófora que presenta una gran capacidad de absorción de la radiación

UV, en donde estabilizan a los radicales libres por deslocalización de los mismos en la molécula, previniendo el envejecimiento prematuro y la interacción de especies reactivas de oxígeno (EROS) con el DNA de la piel (CHATELAIN, E., et al. 2003, p 29).

Por esta razón aludiendo al Objetivo 3 del Plan Nacional para el Buen Vivir, para mejorar la calidad de vida de la población y garantizar los derechos de la naturaleza promoviendo la sostenibilidad, ambiental territorial y global es necesario impulsar acciones integrales para la disminución de la morbilidad, y es así como el aprovechamiento del conocimiento etnobotánico y biodiversidad autóctona de los componentes flavónicos presentes en plantas andinas ecuatorianas que se desarrollan en pisos climáticos superiores a los 2000 metros como es el caso de *Bidens andicola* (Ñachag), una asterácea endémica andina; cuyos metabolitos estudiados en las partes aéreas de la planta corresponden a flavonoides, flavonoles y esterés glicosilados de chalconas (DE TOMMASI, N., et al. 1998, p 975), que en nuestra investigación serán estudiadas como potencial fuente de filtros solares naturales.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Radiación Ultravioleta

La radiación solar es energía radiante electromagnética que se encuentra compuesta espectrofotométricamente por la luz ultravioleta cuyo rango de longitud de onda es de 100-400nm, luz visible de 400 a 760nm e infrarroja de 760 a 1800nm, también se encuentran presentes longitudes de onda corta ionizantes, y longitudes de onda larga como microondas y radiofrecuencia. Estas radiaciones son modificadas de manera importante por su paso a través de la atmósfera y solamente dos tercios de esta energía penetra en la Tierra (AFAQ, F. 2011, p144).

La radiación UV se divide en tres bandas: UV-A (320 a 400nm), UVB (280 a 320), y la UV-C (200 a 280 nm). Siendo la filtración diferente para la radiación UV-A ya que no es filtrada por la capa de ozono en el mismo grado que la UV-B y la UV-C. Asimismo la radiación UV-B comprende aproximadamente el 5% de la radiación UV, y la UV-A el 95% restante (BISSETT, D., et al. 1991, p 324). Sin embargo la UV-B es más responsable que la UV-A en producir daño biológico, ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar, la UVA sólo produce el 20% restante. Por ésta razón se puede afirmar que la cantidad de radiación UV y luz visible que alcanzan un cierto nivel de la piel varía con su longitud de onda. En general, las longitudes de onda largas penetran más profundamente, lo cual se puede explicar por las propiedades ópticas de la piel (CHATELAIN, E., et al. 2003, p 29). Cuando la luz visible y la UV alcanzan la piel, una parte es reflejada y otra es absorbida, y otra parte es transmitida a diferentes capas de células, hasta la disipación del rayo de sol incidente. Por esto la porción de luz que es absorbida por las moléculas en los tejidos es la más importante ya que se trata de la energía que puede causar respuestas tisulares (CHATELAIN, E., et al. 2003, p 30).

La radiación ultravioleta en primera instancia es absorbida por moléculas en la piel denominadas cromóforos endógenos como el DNA, la melanina, el ácido urocánico,

pequeños péptidos, y el colesterol o también por sustancias exógenas como los principios activos fotosensibilizantes, capaces de inducir una respuesta fotobiológica, como una quemadura solar (DELICONSTANTINOS, G. et al. 1996, p 1021). Debido a esto los niveles de penetración de los rayos UV-B y UV-A a nivel de la piel son diferentes, correspondiéndole el 70% de la absorción a nivel de estrato córneo epidérmico a la radiación UV-B, que se diferencia de la radiación UV-A que es absorbida entre el 70-80% por células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal (FERREIRA, T. 2012, p 135).

1.2 Índice Ultravioleta (UVI)

El índice ultravioleta (UVI o Ultra Violet Index) es una medida de la intensidad de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la Tierra. Este índice cuantifica los niveles de radiación UV en relación con sus efectos sobre la piel humana. El UVI se calcula a partir de la cantidad de radiación UV recibida en una localidad en un tiempo determinado, haciendo intervenir también al espectro de acción eritemático (es decir, la capacidad de las distintas longitudes de onda ultravioletas para producir eritema (NASH, J. 2009, p 35).

El índice tiene un valor mínimo teórico de 0 y no tiene un valor máximo. Este índice estándar permite emitir predicciones de UVI comparables en todo el mundo. Los colores utilizados son el verde para UVI bajo (entre 0 y 2), el amarillo para UVI moderado (entre 3 y 5), el naranja con un riesgo alto (entre 6 y 7), el rojo para UVI muy alto (entre 8 y 10) y el morado para UVI extremo (superior a 11).

Dependiendo del valor del UVI, es necesario tomar medidas adecuadas para la protección de la radiación ultravioleta. (OMS. 2003, pp 14-16)

1.3 Efectos Biológicos de la Radiación UV-A y UV-B

La radiación UV presenta efectos positivos sobre el ser humano, ya que favorece la síntesis de vitamina D, pero puede ser enormemente perjudicial cuando se sobrepasan los límites de seguridad. Por ésta razón la exposición excesiva a la radiación UV solar puede dar lugar a efectos tanto agudos como crónicos, especialmente para la piel y los ojos, que son los órganos más expuestos. Los efectos agudos incluyen desde eritema (enrojecimiento) y quemaduras en la piel hasta fotoqueratitis (inflamación de la córnea y el iris) y fotoconjuntivitis (inflamación de la conjuntiva) (GILABERTE, Y., et al. 2010, p 660). Además los efectos crónicos incluyen el cáncer de piel y su fotoenvejecimiento (envejecimiento prematuro), y en el caso de los ojos, las cataratas (opacidad del

cristalino) y el cáncer de conjuntiva. También el sistema inmunológico puede resultar afectado por la sobreexposición, a través de una disminución de su funcionamiento general y de las defensas naturales de la piel, por lo que aumentan la sensibilidad de ésta al sol, el riesgo de infecciones y posibles reacciones alérgicas a ciertos medicamentos como antraquinonas y quinolonas. (FERREIRA, T. 2012, p 140)

Asimismo se le puede atribuir la responsabilidad a la radiación UV-B de provocar un efecto pronunciado en la capa subcutánea que puede alterar la estructura de las fibras de colágeno y elastina, acelerando el envejecimiento de la piel (CHATELAIN, E., et al. 2003, p 29).

1.3.1 Pigmentación de la Piel

La pigmentación verdadera es un proceso enzimático, en el que, a partir de la tirosina y su transformación en dopa, se continúa el proceso metabólico hasta la síntesis de melanina. Este proceso se establece en un plazo de 48 horas tras la exposición y tiene su máximo a los 14 días; desaparece a las 4-6 semanas de abandonar la exposición. Siendo la melanogénesis por UVB acompañada de hiperemia y además se encuentra influenciada por hormonas relacionadas con la tirosinasa, como andrógenos, estrógenos y MSH. Es por eso que la epidermis presenta un complejo mecanismo protector de la radiación solar como es la melanina considerada como el verdadero y único filtro para la radiación UV, aunque cada vez se concede más importancia como filtrante solar a los queratinocitos, lípidos y proteínas epidérmicas. (RODRIGUEZ, M. 1990, p 32)

Sin embargo la radiación UV-B posee mayor energía pero penetra poco en la piel, a corto plazo y en exceso provoca eritema cutáneo y desencadena el proceso de bronceado a través de la formación de melanina. La radiación UV-A tiene mayor longitud de onda y es mayor energética que la UV-B pero a diferencia de ésta, se encuentra en cantidades importantes a lo largo del día y todo el año, afectando poco a la epidermis pero incidiendo de forma latente sobre la dermis, por ello es la radiación que mayor alcance tiene a nivel de la piel y mayores efectos acumulativos provoca en la misma. Éstos efectos son pigmentación directa, aparición de bronceado inmediato, fotooxidación de los precursores de la melanina, degradación física y química del colágeno y elastina. (RODRIGUEZ, M. 1990, p 47)

1.3.2 Estimulación de la Queratogénesis

La radiación UVB estimula las mitosis de los queratinocitos y produce engrosamiento del estrato córneo, que puede triplicarse a las 72 horas de exposición solar.

1.3.3 Fotoenvejecimiento Prematuro

La radiación UV-A tiene efectos a largo plazo como es el fotoenvejecimiento prematuro de la piel provocado por una degradación de la elastina y colágeno que provoca elastosis, intensa sequedad cutánea, arrugas muy definidas, flacidez entre otras, debido a que sus fotones tienen la energía suficiente para degradar de forma crónica a los puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro que estabilizan las estructuras de las mencionadas proteínas. (GILABERTE, Y., et al. 2010, p 662)

1.3.4 Fotoalergenicidad

La radiación UV-A y B produce una alteración del sistema inmunológico debido a una disminución de células dérmicas de Langerhans comprometiendo sus funciones inmunológicas primarias desencadenando en alergias solares como la lucitis estival benigna provocada especialmente por la radiación UV-A que se manifiesta por la aparición de una erupción acompañada de prurito en espalda, manos y pecho. Y cuando la exposición es crónica la radiación UV-A es responsable de reacciones fototóxicas y fotosensibilizantes por generación de ERO`S. (FERREIRA, T. 2012, p 136)

1.3.5 Cáncer De Piel

El cáncer de piel representa el tipo más frecuente de cáncer humano, con una incidencia que va en aumento en los últimos años. La exposición excesiva a la radiación ultravioleta (UV) de la luz solar se asocia de forma directa con la aparición de tumores no-melanoma. En los tumores de piel no-melanoma, la radiación ultravioleta es la responsable de la producción de mutaciones puntuales en genes. Así el 99% de ellos corresponden a tumores de piel no-melanoma, carcinoma basocelular (CBC) y espinocelular (CEC); el melanoma maligno representa un porcentaje muy pequeño, que sin embargo dada su agresividad es el responsable de la mayoría de los fallecimientos ocasionados por cáncer de piel. (FERREIRA, T. 2012, p 136)

Dentro de los tumores de piel no melanoma, el carcinoma basocelular representa la forma más frecuente de cáncer de piel, seguido por el espinocelular. En donde la predisposición para la aparición de estos tipos de neoplasias dérmicas son la exposición

prolongada y repetida a la radiación ultravioleta de la luz solar (F'GUYER, S. 2003, p 56). Ambos tumores son de origen epitelial, el carcinoma basocelular se origina a partir de las células epidérmicas pluripotenciales de la capa basal y menos frecuentemente de los anexos cutáneos. En algunos síndromes genéticos, y también en pacientes inmunodeprimidos, existe una especial predisposición a desarrollar carcinoma basocelular. Aproximadamente el 80% se desarrolla en sitios expuestos de cabeza y cuello. Es un tumor de lento crecimiento sin embargo las metástasis son excepcionales. Así también el carcinoma espinocelular se origina a partir de los queratinocitos o sus anexos epidérmicos (F'GUYER, S. 2003, p 58).

1.4 Fotoprotección

Los fotoprotectores contienen moléculas o complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de radiación UV. Para prevenir el eritema y la quemadura solar es necesaria una protección frente a la radiación UVB y UVA. Por ello, un fotoprotector novedoso es aquel que puede prevenir, mejorar o incluso reparar los daños cutáneos inducidos por la radiación solar. (KULLAVANIJAYA, P. 2005, p 937)

Los efectos de protección se puede clasificar de acuerdo a mecanismos como:

- 1) Absorción directa de fotones
- 2) Inhibición de la inflamación crónica
- 3) Modulación de la inmunosupresión
- 4) Inducción de apoptosis
- 5) Actividad antioxidante directa para neutralizar o atrapar especies reactivas del oxígeno
- 6) Antioxidante indirecta (Inducción de las respuestas citoprotectoras intrínsecas que permiten la detoxificación de diversos oxidantes)

Los fotoprotectores tienen que ser seguros, no solo para los seres humanos que se los aplican sobre todo el tegumento expuesto al sol, sino también para el medio ambiente, que indirectamente los recibe durante su eliminación.

La fotoprotección es una estrategia preventiva y terapéutica fundamental frente al fotoenvejecimiento y el cáncer de piel (HUPEL, M. 2011, p 362).

1.4.1 Factor de Protección Solar

El Factor de Protección Solar (FPS) o Índice de Protección (IP), nos indica el número de veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema o enrojecimiento previo a la quemadura. Se lo puede calcular mediante la relación de la menor cantidad de energía ultravioleta requerida para producir un eritema mínimo sobre piel protegida por el protector solar a la cantidad de energía requerida para producir el mismo eritema en piel sin protección (MANSUR, J., et al. 1986, p 122).

También se le conoce como un indicador del tiempo máximo que puede estar una persona expuesta al sol sin quemarse o que debe re-aplicar el protector solar, en dependencia del tipo de piel será el tiempo de protección natural que cada persona tenga (KULLAVANIJAYA, P. 2005, p 950).

El valor de FPS de uso depende de factores como la zona geográfica a la que se encuentra en exposición un individuo, actividades, tipo de piel, tipo de persona, la cantidad absorbida de protector solar entre otras, además estudios comprueban que aumentos del FPS no representan incrementos de reducción del eritema o son mínimos, por lo que la FDA recomienda la utilización de protectores solares con FPS 30 como máximo debido a razones de costo innecesarias y efectos secundarios al emplear concentraciones mayores de sustancias fotoprotectoras (DUTRA, E., et al. 2004, p 381).

La clasificación de acuerdo a COLIPA (Cosmetics Europe Personal Care Association) establece el tipo de protección según el FPS de la siguiente manera:

TABLA 1-1. CLASIFICACIÓN DE FPS SEGÚN COLIPA

FPS	TIPO DE FOTOPROTECCIÓN	INTENSIDAD SOLAR
2,4, 6	Bajo	Baja
8, 10, 12	Medio	Media
15, 20, 25	Alto	Alta
30, 40, 50	Muy alto	Alta
+ 50	Ultra	Muy alta

1.4.2 Fotoprotectores tópicos

Los fotoprotectores tópicos pueden prevenir e incluso reparar el daño causado por la exposición la radiación UV en modelos animales (FGUYER, S. 2003, p 56). En los seres humanos se ha probado que previenen los efectos agudos del sol y reducen la incidencia

de algunos tipos de cáncer de piel, como el carcinoma de células escamosas. Se ha demostrado que el uso diario de un fotoprotector de amplio espectro puede reducir significativamente el daño cutáneo inducido por la radiación UV (DUTRA, E., et al. 2004, p 3890).

Además, los fotoprotectores de amplio espectro, con al menos FPS para radiación UVB de 25 y frente a UVA de 14, protegen no solo frente a la quemadura solar sino también frente a la fotoinmunosupresión. Idealmente, los fotoprotectores deben proteger frente a las radiaciones UVB y UVA, ser capaces de atrapar radicales libres, poseer enzimas o sustancias activas que estimulen los sistemas de reparación del ADN y, por supuesto, ser estables y seguros (BISSETT, D., et al. 1991, p 323).

1.4.3 Tipos de fotoprotectores

1.4.3.1 Filtros químicos u orgánicos

Los filtros químicos son compuestos orgánicos, aromáticos, que pueden absorber la radiación UV. En función de la longitud de onda absorbida se distingue entre los filtros UVB, UVA y de amplio espectro. La energía absorbida es emitida nuevamente como radiación térmica (NASH, J., 2006, p 37).

1.4.3.2 Filtros físicos o inorgánicos

Los filtros físicos consisten en partículas considerablemente grandes que dispersan, reflejan o absorben la radiación solar en la franja UV, visible e incluso infrarroja. Dos tipos de partículas inorgánicas son ampliamente utilizadas en los fotoprotectores: el óxido de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO₂) micronizados (NASH, J., 2006, p 39).

1.4.3.3 Agentes antioxidantes

La radiación UV causa daño en el ADN, oxidación de las proteínas e induce la síntesis de metaloproteinasas (MMP). La fotoprotección mediante el uso de antioxidantes vegetales para lograr proteger la piel humana debe a su capacidad molecular de prevenir la oxidación y evitar la generación de radicales libres (SAMBANDAN, D. 2011, p 748).

1.4.4 Fotoprotectores naturales

1.4.4.1 Polifenoles

Son un grupo de sustancias químicas encontradas en las plantas caracterizadas por la presencia de un grupo fenol por molécula (NICHOLS, J. 2009, p 72). Los polifenoles son

generalmente subdivididos en taninos hidrolizables y fenilpropanoides en donde se incluyen los flavonoides, entre otros (MUJWAH, A., et al. 2010, p 86).

1.4.4.2 Flavonoides

Son metabolitos secundarios presentes como pigmentos naturales de los vegetales que tienen la función de proteger del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas o la polución ambiental, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (SHARAPIN, S. 2000, p 35). Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras, así como en diversas bebidas, y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (LOCK, O. 1994, p 112). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo. Además, tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías (ELMETS, C., et al. 2001, p 432).

Los flavonoides presentan una estructura base como se evidencia en la Fig. 1 compuesta por dos anillos A y B unidos por una cadena de tres carbonos C. la biogénesis de la misma es mixta ya que el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C de la ruta del ácido shikímico. En función de sus características estructurales que presentan variaciones en la cadena central C los flavonoides se pueden clasificar en: flavonas, flavanos, como la catequina; flavonoles, representados por la quercetina, flavonas, antocianidinas, catequinas, auronas, isoflavonoides. (LOCK, O. 1994, pp 115-120).

Existe un buen número de sustancias procedentes del reino vegetal con excelentes propiedades fotoprotectoras, que aplicadas tópicamente pueden prevenir los efectos nocivos del sol en la piel. Ya que en cuanto a sus efectos fotoprotectores, los flavonoides por un lado absorben la radiación UV, de otro poseen actividad antioxidante directa e indirecta y, por último, modulan diversas vías de señalización. Por tal motivo se han identificado más de 5.000 flavonoides, que han demostrado algún efecto fotoprotector. Además han indicado bloquear la radiación UVA y UVB y presentar actividad de antifotoenvejecimiento (MUJWAH, A., et al. 2010, p 85)

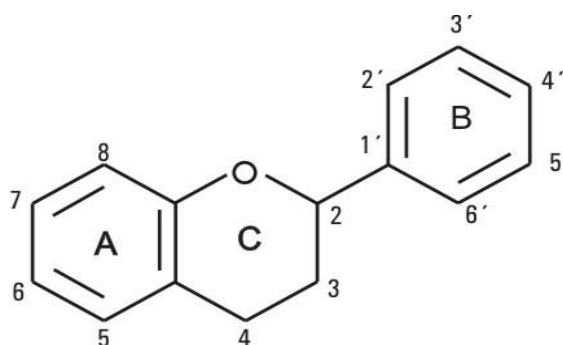


FIGURA 1-1. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES

1.5 *Bidens andicola* Kunth



FOTOGRAFÍA 1-1. *Bidens andicola* Kunth.

FUENTE: MAYRA TINAJERO

1.5.1 Clasificación científica

TABLA 2-1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Bidens andicola* Kunth

Reino: Plantae	División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida	Orden: Asterales
Familia: Asteraceae	Subfamilia: Asteroideae
Tribu: Coreopsideae	Género: <i>Bidens</i>
Epíteto Específico: andicola	Autor Epíteto Específico: Kunth
	Nombre vulgar: Ñachag(kichwa), nachak sisa, ñachi, ñakachay, flor de ñachak

1.5.2 Características botánicas

Hierba anual de 40 cm de alto. Las flores se encuentran en inflorescencias de 4 a 5 cm de diámetro. El ñachag está ampliamente propagado en la zona andina ecuatoriana y florece de octubre a julio a alturas de 3.700 a 4.100 msnm (CUTIPA, CH. 1991, p 121).

Presenta raíz típica; tallo delgado y ramificado. Hojas opuestas, compuestas, imparipinnadas. Inflorescencias en capítulos terminales; cáliz con sépalos modificados en dos pelos ancistrosos y duros de color café; flores marginales, liguladas, con 3 dientes en el ápice, amarillas, con la nervadura de color café; las centrales, tubulosas, pentadentadas, de color anaranjado, rodeadas de una bractéola más grande que la corola, con escasa pilosidad y de color café; estambres con anteras unidas; ovario ínfero, estilo apical, dividido en dos ramas (CUTIPA, CH. 1991, p 123).

1.5.3 Uso medicinal

Se emplea como remedio casero, antirreumático. Las flores, en cocción junto a otras especies, se utilizan para tratar afecciones al hígado, reumatismo, riñones y hemorragias internas. También añadiendo las flores al hervir la leche, para mejorar su sabor. Finalmente se utilizan los pétalos que contienen luteína para teñir lana, fibra y tejidos (ORDÓÑEZ, V. 2006, p 123).

1.5.4 Ecología y ubicación geográfica en Ecuador

Se desarrolla y se la encuentra en cualquier época del año. Crece en andenes abandonados y áridos. Se encuentra en toda la serranía ecuatoriana y en algunas provincias del oriente (ORDÓÑEZ, V. 2006, p 128).

1.5.5 Composición y principios activos

Estudios farmacognósticos previos de *Bidens andicola* indican que presentan metabolito secundarios como taninos, esteroides, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides tales como los isómeros de flavonas llamadas chalconas y 7, 8, 3', 4' tetrahidroxiflavanona (principios activos principales) flavonol 7-O-glicósidos (1-5), que tienen la quercetina o la quercetina éter 3-metilo como sus agliconas, y cadenas de azúcar formadas por tres o cuatro azúcares, incluidas la beta-D-glucopiranosas, alfa-L-rhamnopyranose, y beta-D-xilopiranosas y glicósidos de éster de chalcona (DE TOMMASI, N., et al. 1998, p 974).

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Lugar de la investigación

La presente investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Investigación, Desarrollo e Innovación de Fitofarmacia, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Parroquia Lizarzaburu, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.2 Materiales, equipos y reactivos

2.2.1 *Material vegetal*

El material vegetal utilizado en la presente investigación fueron las partes aéreas de *Bidens andicola* (Ñachag), recolectadas en el mes de junio en la parroquia Izamba, Cantón Ambato, Provincia de Tungurahua.

2.2.2 *Reactivos*

Los reactivos utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

Acetato de etilo: Líquido incoloro de olor característico con fórmula molecular $C_4H_8O_2$, insoluble en agua con peso molecular de 88,11 g/mol, punto de ebullición 77°C. (Sigma-Aldrich, España).

Ácido Clorhídrico conc: Líquido incoloro de olor penetrante, inflamable, volátil, altamente miscible en agua con fórmula molecular HCl, al 37%(m/m) densidad de 1,19 g/mL. (JT Backer, USA)

Ácido Sulfúrico conc: Líquido incoloro e inodoro, corrosivo, con fórmula molecular H_2SO_4 , al 98% (m/m) de pureza y densidad de 1,84 g/mL a 20 °C. (JT Backer, USA)

Caldo Soya Triptica: Sólido amarillo soluble en agua de olor característico (Merck, Ecuador)

Cloruro de aluminio: Sólido blanco o amarillo pálido, higroscópico, soluble en agua con fórmula molecular AlCl_3 y peso molar de 133,34 g/mol (Panreac, España)

Dimetilsulfóxido (DMSO): Líquido higroscópico transparente de olor característico, miscible en agua con punto de ebullición de 189°C , con fórmula molecular $\text{C}_2\text{H}_6\text{O-S}$ y masa molar de 78,1 g/mol. (JT Backer, USA)

Etanol al 96°: Líquido transparente con formula molecular $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, al 96% de pureza (PROLABOR, Riobamba),

Hexano: Líquido incoloro inflamable con formula molecular C_6H_{14} , Insoluble en agua con peso molecular 86,18 g/mol, punto de ebullición 68°C . (Sigma-Aldrich, España).

Hidróxido de amonio: Líquido incoloro, fuertemente irritante, inflamable, con fórmula molecular NH_3OH , a una concentración de amoniaco del $26-28^\circ\text{C}$. (VWR, Bélgica)

Metanol absoluto: Líquido incoloro, inflamable totalmente miscible en agua con fórmula molecular CH_4O , con peso molecular 32,04g/mol y punto de ebullición 65°C . (JT Backer, USA)

Peptona: Sólido de color blanco soluble en agua (Merck, Ecuador)

Plate Count Agar: Sólido amarillo, soluble en agua de olor característico (Merck, Ecuador)

Vainillina: Sólido blanco o ligeramente amarillento, de olor agradable, insoluble en agua con formula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, con masa molar de 152,15g/mol (Sigma-Aldrich, España)

Todos los demás reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico.

2.2.3 Equipos e instrumentos

Rotavapor: Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000.

Estufa: Estufa Memmert universal con circulación forzada.

Espectrometro IR: Espectrómetro Jasco FT/IR-4100.

Espectrofotometro U.V: Espectrofotómetro Spectronic Helios Alpha UV-Vis.

Balanza Analítica, pH-metro, Revelador Luz U.V. 365nm

2.3 Métodos y técnicas

2.3.1 *Recolección e identificación del material vegetal*

Las partes aéreas de la muestra vegetal fueron recolectadas de *Bidens andicola* en la zona de Ambato Parroquia Izamba, donde se verificó con un GPS las coordenadas geográficas que son 1°14'60" S y 77°35'60" W, se encuentra a una temperatura de 14°C y altitud de 2570 msnm. Además se identificó una muestra de la planta entera en el herbario de la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO en donde se confirmó el género y especie del material vegetal.

2.3.2 *Determinación del Contenido de Humedad*

La determinación de humedad de la muestra vegetal se realiza mediante la técnica de pérdida por desecación, estableciéndose que los límites en el contenido de agua debe ser de acuerdo a las farmacopeas entre 8-14%.

El método utilizado fue gravimetría en donde se pesaron 2g ±5 de droga cruda y se ubicó en un pesa filtro tarado, se prosigue a secar en una estufa a 50°C un tiempo de 3 horas. Se colocó posteriormente en un desecador enfriando la droga cruda hasta temperatura ambiente para pesarla, nuevamente se repite el proceso pesando cada hora hasta peso constante, realizándose el ensayo por triplicado.

Cálculo:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M} \times 100$$

Donde:

H: Humedad en porcentaje

M: Masa de la muestra en gramos.

M₁: Masa del pesa filtro con muestra desecada en gramos

M₂: Masa del pesa filtro con la muestra de ensayo en gramos

100: Factor matemático de porcentaje

2.3.3 Determinación de Sólidos Totales

El ensayo de sólidos totales nos permite determinar la pérdida de sustancias volátiles por un proceso de evaporación mediante calor y secado del residuo en estufa, hasta masa constante. Para esto, se tomó 5mL del extracto de acetato de etilo y se colocó en una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evaporó en baño de agua hasta sequedad. Se colocó en una estufa de circulación de aire y se mide el peso hasta que sea constante (aproximadamente 3 horas). Se retira la cápsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta temperatura ambiente. Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

Cálculos:

Los sólidos totales, expresados en porcentaje, se calculan aplicando la siguiente fórmula:

$$St = \frac{P_r - P}{V} \times 100$$

Donde:

Pr = Masa de la cápsula más el residuo en gramos

P = Masa de la cápsula vacía en gramos.

V = Volumen de ensayo

100 = Factor matemático de porcentaje

2.4 Tamizaje Fitoquímico

Son pruebas cualitativas preliminares que nos permiten determinar mediante un screening la presencia o ausencia de compuestos característicos presentes en el subextracto de la droga vegetal.

2.4.1 Extracción y aislamiento del componente flavónico

Las partes aéreas (flores) de *Bidens andicola* se deshidrataron en una estufa (Mermmet) con circulación de aire a 40°C, hasta humedad menor al 3%. Posteriormente se disminuyó su tamaño de partícula y tamizó el producto seco por malla de 2mm. El polvo seco (30g aproximadamente) se desengrasó en un equipo soxhlet con hexano (100mL). El material desengrasado se extrajo continuamente con éter etílico, acetato de etilo, mezclas azeotrópicas de acetato de etilo-etanol (70:30), éter-etanol (40:60), etanol y metanol, con 100mL durante 4 horas a 60°C cada una. Los subextractos así obtenidos fueron filtrados y concentrados bajo presión reducida utilizando un rotavapor (Heidolph), el residuo fue reconstituido con 60mL de metanol absoluto.

De cada subextracto a distinta polaridad se analizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) como fase estacionario y fase móvil Cloroformo: Acetato de Etilo: Metanol (5,8: 2,7: 2,2), posteriormente se reveló con lámpara de luz fluorescente UV-A 365nm y sulfato de cerio, además se obtuvo su espectro UV. Posteriormente, el subextracto que presentó mayor variedad y cantidad de compuestos flavónicos, fue escogido para el análisis de sus compuestos, los cuales fueron separados e identificados mediante técnicas colorimétricas confirmatorias con Shinoda. Cada flavonoide fue aislado mediante cromatografía preparativa e identificado por espectroscopía ultravioleta (UV) obteniéndose su espectro de absorción en el rango de 200-400nm.

2.4.2 Aislamiento y Caracterización Fitoquímica del Marcador Flavónico

El flavonoide seleccionado como marcador fitoquímico fue aislado a partir del subextracto en acetato de etilo, mediante cromatografía preparativa en capa fina utilizando placas de 20cm x 20cm de Silica Gel F254 (Merck), y como fase móvil Cloroformo: Acetato de Etilo: Metanol (5,8: 2,7: 2,2), la fracción de Sílica que contenía al marcador fitoquímico se suspendió en metanol absoluto y una agitación vigorosa fue llevada a cabo durante 2 horas, después se filtró y evaporó el solvente hasta obtener el producto cristalizado, todo este proceso fue cuantitativamente desarrollado. El marcador fitoquímico aislado fue caracterizado mediante espectroscopía UV (Espectrofotómetro Spectronic Helios Alpha UV-Vis) para evaluar su estructura mediante desplazamientos batocrómicos con AlCl₃ al 5% en metanol con y sin HCl concentrado., Metóxido de

sodio al 1% y Acetato de sodio al 5% en metanol, con el fin de evidenciar la presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula. Además se realizó la identificación de grupos funcionales característicos del esqueleto C₆-C₃-C₆ utilizando espectroscopía IR (Jasco FT/IR-4100) de 400 a 4000cm⁻¹.

2.4.3 Evaluación de la actividad fotoprotectora in-vitro

2.4.3.1 Unidades de Observación.

Unidades formadoras de Colonias de Bacterias de *Escherichia coli* ATCC 25922 con muerte celular inducida por radiación ultravioleta UV-A.

2.4.3.2 Efecto protector contra la radiación ultravioleta UV-A por muerte celular inducida.

Para el presente estudio se preparó una suspensión de *Escherichia coli* (ATCC 25922) a una concentración de 1,5x10⁸ UFC/ml en agua peptonada (tamponada pH= 7); 100µl del cultivo fueron transferidos a 9,9 ml de las muestras de los subextractos -que presentaron mayor absorción en el espectro UV-Visible- preparados a una concentración del 1% (v/v) en agua peptonada, (contenidos en tubos de cuarzo con un espesor de 1mm). Se realizó además una prueba blanco con metanol al 1% y un control negativo con agua peptonada. A cada unidad experimental se irradió con una lámpara UV-A durante 60 minutos. Trascurrido este tiempo se determinó el número de UFC/ml, empleando el método de dilución en placa (FIGUEIREDO, S., et al. 2014, pp. 65-70).

Se empleó un diseño factorial mediante la selección de factores correspondientes a 4 subextractos obtenidos a diferentes polaridades. Los cuales se medirán a un nivel de 1% concentración permitida por la FDA para filtros solares químicos.

TABLA 1-2. GRUPOS DE ESTUDIO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR CONTRA LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA UV-A INDUCIDA POR MUERTE CELULAR

FACTOR	NIVEL	TRATAMIENTO	VARIABLE RESPUESTA
Blanco (Metanol+ AP)	1%	RADIACIÓN UV-A 60min	UFC/ml
Control negativo	1%	-----	UFC/ml
n-Subextractos	1%	RADIACIÓN UV-A 60min	UFC/ml

2.4.3.3 Determinación del Factor de Protección Solar

Se preparó una solución a una concentración de 100ppm del subextracto en acetato de etilo y el marcador fitoquímico, de esta solución se obtiene su espectro de absorción, en un espectrofotómetro UV en el rango de 290 a 320nm, utilizando una celda de cuarzo de un 1cm, y una solución de etanol como blanco. Además se leen por triplicado los datos de absorbancia de 290 a 320nm cada 5nm. Y se determina el Factor de Protección Solar aplicando la ecuación de Mansur.

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Donde $EE(\lambda)$ es el espectro de acción eritemal, $I(\lambda)$ es la intensidad del espectro solar, $Abs(\lambda)$ es la absorbancia del producto, CF es el factor de corrección igual a 10 que se determina con un filtro solar estándar que contiene 8% de homosalato con un SPF de 4, determinado espectrofotométricamente (MANSUR, J., et al. 1986, p 123). Los valores de $EE \times I$ son constantes y fueron determinados por el Comité Científico Sobre Productos del Consumidor de la Comisión Europea.

2.4.3.4 Evaluación de la citotoxicidad en *Artemia salina*

Se evaluó la citotoxicidad en *Artemia salina* del subextracto en acetato de etilo y el marcador fitoquímico, para lo cual los huevos de este crustáceo se incuban en solución de sal marina al 3.8% a una temperatura de 25-28°C, en presencia de luz artificial durante 48horas. Las muestras de subextracto se evalúan a concentración de 1500, 1000, 500, 100 y 10 ppm. Se agrega a cada tubo de ensayo 10 nauplios vivos y se afora a 5mL, se incuban a temperatura ambiente por 24horas y se realiza el monitoreo a las 24 horas; como control se usa la solución de sal marina con 10 nauplios. Al cabo de este período de tiempo se contabilizan los organismos vivos y se calcula la concentración letal media CL_{50} con la siguiente fórmula: (HUMAN, S., et al. 2003, p 70)

$$\text{Log } CL_{50} = \log X_1 + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log(X_2)] - [\log(X_1)]$$

Donde

X_1 : Concentración inhibición $Y_1 > 50\%$

X_2 : Concentración inhibición $Y_2 < 50\%$

TABLA 2-2. FACTORES Y VARIABLES DE RESPUESTA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN *Artemia salina*

FACTORES		NIVELES (ppm)					VARIABLES RESPUESTA			
GB	AA	1500	1000	500	100	10	NM	NV	L	C
GC (-)	AA	1500	1000	500	100	10	NM	NV	L	C
CF	AA	1500	1000	500	100	10	NM	NV	L	C

GB: GRUPO BLANCO, **GC (-):** GRUPO CONTROL (-), **CF:** Componente flavónico, **AA:** Asignación Aleatoria *Artemia Salina*, **NIVELES:** Concentración de CF (ppm), **NM:**Número de muertos, **NV:** Número de vivos, **L:** Letalidad en %, **C:** Categoría de toxicidad.

2.4.3.5 Clasificación de toxicidad según CYTED

TABLA 3-2. CLASIFICACIÓN DE TOXICIDAD SEGÚN CYTED

I	Extremadamente tóxico	1-10ppm
II	Altamente tóxico	10-100ppm
III	Moderadamente tóxico	100-500ppm
IV	Ligeramente tóxico	500-1000ppm
V	No tóxico	1000-1500ppm
VI	Relativamente inocuo	>1500ppm

CAPITULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del Contenido de Humedad

Mediante el método gravimétrico se determinó que el contenido de humedad de *Bidens andicola*, como droga seca.

TABLA 1-3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA DROGA SECA

DE *Bidens andicola* (Ñachag)

% de Humedad		Límite de Humedad USP
Droga seca	9%	8-14%

El dato obtenido de porcentaje de humedad de la droga cruda de *Bidens andicola* se encuentra dentro de los límites de la USP, se controló estrictamente a temperatura del proceso con el fin de evitar la degradación de compuestos termolábiles. El resultado obtenido nos indica que posterior al secado, la humedad residual menor al 10% evita procesos enzimáticos de degradación o proliferación bacteriana, lo que puede desencadenar en la pérdida de la acción cosmeceútica de la planta.

3.2 Determinación de Sólidos Totales

TABLA 2-3. SÓLIDOS TOTALES DEL SUBEXTRACTO ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (ÑACHAG)

Parámetro	Método	Resultado
Sólidos Totales	Gravimetría	7,8%

Los sólidos totales son un parámetro que nos indica la cantidad de materia orgánica que posee la planta susceptible de extracción en el caso de *Bidens andicola* (Ñachag) es de 7.8%.

3.3 Tamizaje Fitoquímico

Con el tamizaje fitoquímico los resultados representativos para metabolitos pertenecientes al subextracto de acetato de etilo de *Bidens andicola* son para flavonoides y antocianidinas, los mismos que son responsables de las coloraciones características (color rojo) en ensayos como AlCl_3 . Proporcionando de manera cualitativa la presencia de compuestos cuya estructura molecular ha demostrado ser un potente agente antioxidante y de absorción UV.

TABLA 3-3. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE *Bidens andicola* (Ñachag).

Metabolito secundario de <i>Bidens andicola</i>	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	-
	Ensayo de Mayer	-
	Ensayo de Wagner	-
Terpenoides	Ensayo de Lieberman-Burchard	-
Quininas	Ensayo de Borntrager	-
Cumarinas	Ensayo De Baljet	-
Compuestos Grasos	Ensayo de Sudan III	+
Catequinas	Ensayo de Catequinas	-
Resinas	Ensayo de Resinas	-
Saponinas	Ensayo de la Espuma	+
Taninos	Ensayo de Cloruro Férrico	+++
Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	-
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++
	AlCl_3	+++
	Vainillina	++
Antocianidinas	Ensayo de Antocianidinas	++
Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito		

3.4 Determinación de Requisitos Organoléptico.

Las características organolépticas se evaluaron mediante una escala hedónica diferenciándose aspecto, color y olor de cada subextracto obtenido de la especie vegetal *Bidens andicola* (Ñachag).

TABLA 4-3. PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS DEL SUBEXTRACTOS DE *Bidens andicola* (Ñachag).

Subextractos	Parámetros Aspecto	Organolépticos-Color	Resultado Olor
Hexano	Líquido	Amarillo	Característico
Éter etílico	Líquido	Marrón	Dulce
Acetato de etilo	Líquido	Marrón	Dulce
Acetato de etilo-Etanol (70:30)	Líquido	Verde	Característico
Éter etílico-Etanol (40:60)	Líquido	Verde	Característico
Etanol	Líquido	Verde	Dulce
Metanol	Líquido	Verde	Dulce

3.5 Extracción y aislamiento del componente flavónico

3.5.1 Extracción del componente flavónico

TABLA 5-3. CONSTANTES DIELECTRICAS DE SOLVENTES Y MEZCLAS AZEOTRÓPICAS PARA LA EXTRACCIÓN DELCOMPONENTE FLAVÓNICO DE *Bidens andicola* (Ñachag)

Solvente	Constante dieléctrica
Hexano	1,89
Éter etílico	4,34
Acetato de etilo	6,02
Acetato de etilo-Etanol (70:30)	11,68
Éter etílico-Etanol (40:60)	16,32
Etanol	24,3
Metanol	43

3.5.2 Rendimiento de Extracción

El rendimiento de extracción para cada subextracto expresado en porcentaje es de 5,05% para el subextracto hexánico, 0,95% para subextracto en éter etílico, 5,37% para el acetato de etilo, 12,62% para el subextracto de la mezcla azeotrópica de acetato de etilo-Etanol (70:30), 1,23% para el subextracto en éter etílico-etanol (40:60), 11,31% para el subextracto etanólico y 7,64% para el subextracto metanólico con su respectivo cálculo de la concentración en ppm para cada uno como se representa en la tabla 11.

TABLA 6-3. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN FITOQUÍMICA DE *Bidens andicola*

	SH	SE	SAE	SAOH	SEE	SETOH	SMEOH
M₁	95,3318	116,9646	95,3318	116,9646	95,3318	95,3318	116,9646
M₂	96,7900	117,2387	96,8803	120,6069	95,6858	98,5955	119,1657
SE	1,4582	0,2741	1,5485	3,6423	0,354	3,2637	2,2011
B	28,8558						
R	5,05	0,95	5,37	12,62	1,23	11,31	7,63
C(ppm)	24303,33	4568,33	25808,33	60705	5900	54395	36685
M₁ : Peso del Balón Tarado(g), M₂ : Peso Balón + Subextracto (g), SE : Peso del Subextracto (M ₁ - M ₂), B : Peso de flores de <i>Bidens andicola</i> (g), R : % de Rendimiento, C(ppm) : Cálculo de la concentración en ppm de cada subextracto, SH : Subextracto Hexánico, SE :Subextracto Éter etílico, SAE :Subextracto Acetato de etilo, SAOH : Subextracto Acetato de etilo-Etanol (70:30), SEE : Subextracto Éter etílico-Etanol (40:60), SETOH : Subextracto etanólico, SMEOH : Subextracto metanólico.							

3.5.3 Estudio Cromatográfico

Mediante Cromatografía en Capa Fina placas de Sílica Gel 60 F254 (Merck) como fase estacionario y fase móvil Cloroformo: Acetato de Etilo: Metanol (5,8: 2,7: 2,2), posteriormente se reveló con lámpara de luz fluorescente UV-A 365nm y sulfato de cerio al 0,5% en ácido sulfúrico al 65% y se evidenció la presencia de compuestos con los siguientes R_f que se detallan a continuación (Figura 3):

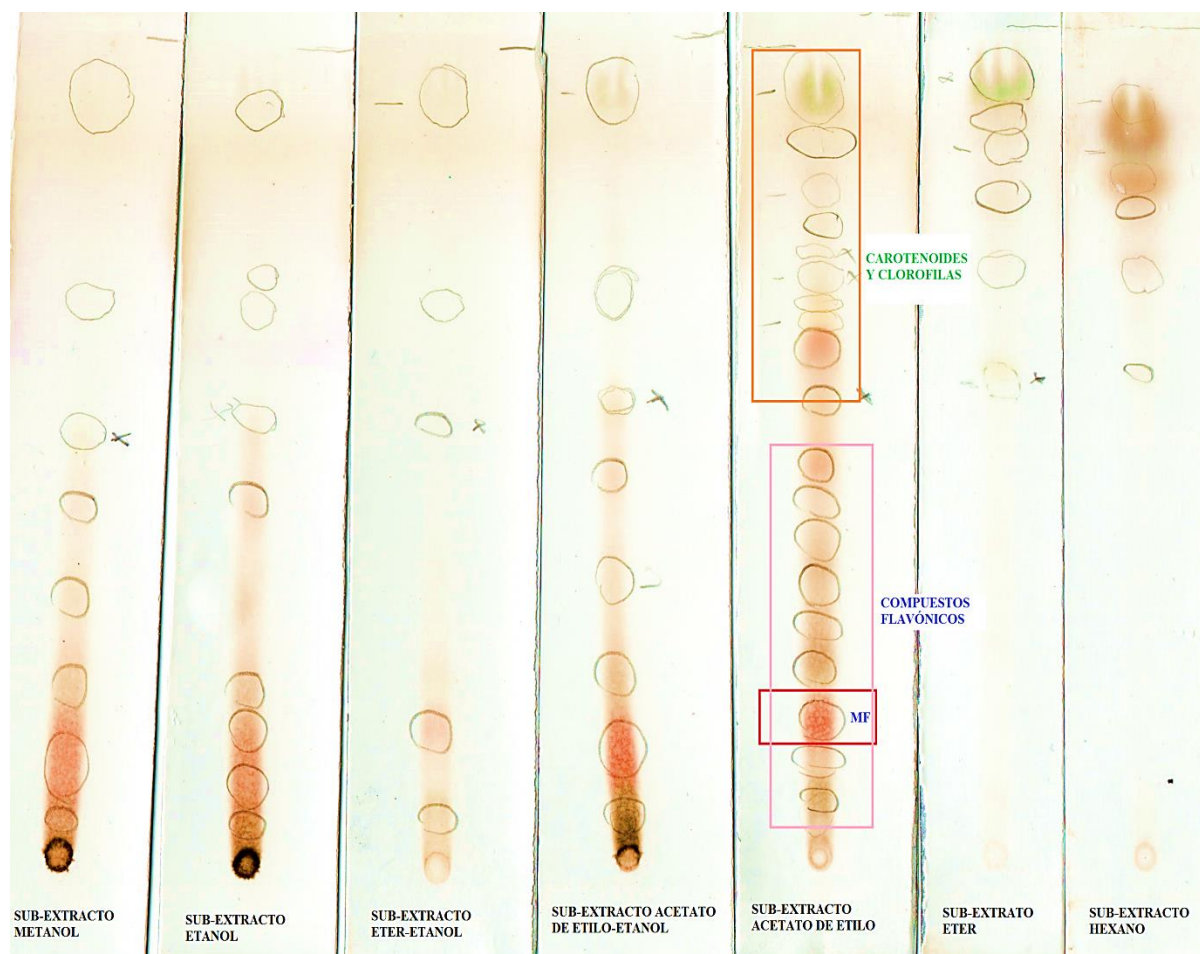


FIGURA 1-3. CROMATOGRAFIA EN SILICA GEL 60 F254 DE 2 X 10 cm, DE LOS SUBEXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *B.andicola*, DE DERECHA A IZQUIERDA: SUBEXTRACTO: HEXANO, ÉTER, ACETATO DE ETILO, ACETATO DE ETILO-ETANOL, ÉTER-ETANOL, ETANOL Y METANOL. SE INDICA EL MARCADOR FITOQUÍMICO ELEGIDO (MF) Y LA PRESENCIA DE COMPUESTOS CAROTENOIDES Y CLOROFILAS. ESPOCH, 2014

El estudio en cromatografía en capa delgada en sílica gel F254 nos permitió la separación del componente flavónico con buena eficiencia, eficacia y resolución mediante el sistema de solventes: Cloroformo: Acetato de Etilo: Metanol (5,8: 2,7: 2,2), con el cual se identificó en el subextracto de acetato de etilo ocho compuestos de interés, los cuales presentan R_f , característicos, como se detalla en la tabla 12.

TABLA 7-3. RF DE COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL SUBEXTRACTO ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* CON FE: SÍLICA GEL 60F254; FM: CLOROFORMO: ACETATO DE ETILO: METANOL (5,8: 2,7: 2,2), REVELADOR: DE LUZ FLUORESCENTE UV-A 365nm Y SULFATO DE CERIO. *COMPUESTOS FLUORESCENTES. **MARCADOR FITOQUÍMICO ELEGIDO.

Compuesto	Rf	Compuesto	Rf
1	0,038	8	0,49*
2	0,063	9	0,54*
3	0,11**	10	0,56*
4	0,16	11	0,63*
5	0,21	12	0,69
6	0,33*	13	0,81*
7	0,40	14	0,93*

Además el marcador fitoquímico establecido en nuestro estudio fue comparado con un estándar de quercetina nos revelan Rf similares de 0,11 para el compuesto número 3, el cual fue escogido por su prevalencia como marcador fitoquímico (Figura 3).



FIGURA 2-3. IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR FITOQUÍMICO, COMPARACIÓN ENTRE SUBEXTRACTO EN ACETATO DE ETILO Y ESTÁNDAR DE QUERCETINA. ESPOCH, 2014

3.5.4 Análisis Cromatográfico para la determinación de Clorofilas y Carotenoides

Los compuestos correspondientes a los Rf 0,54 pertenecen al pigmento de *Bidens andicola*, luteína, 0,81 a clorofila, 0,94 a carotenos; 0,56, 0,69 y 0,63 a otros pigmentos del material vegetal, por lo que se descarta su análisis para evaluación fotoprotectora in-vitro.

TABLA 8-3. RF DE COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL SUBEXTRACTO ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* CON FE: SÍLICA GEL 60F254; FM: DICLOROMETANO: ACETATO DE ETILO: METANOL (4:1:0,5), REVELADOR: DE LUZ FLUORESCENTE UV-A 365nm. *COMPUESTOS FLUORESCENTES.

Compuesto	Rf
1	0,54*
2	0,56*
3	0,63*
4	0,69
5	0,81*
6	0,94

3.5.5 Pruebas colorimétricas para flavonoides

Se aislaron mediante técnica de raspado de silica Gel y posterior disolución en metanol absoluto a todos los ocho compuestos con potencial prototipo flavónico, presentes en el subextracto de Acetato de etilo, a los cuales se les realizó las pruebas colorimétricas confirmatorias de su estructura (Shinoda), como se observa los resultados en la Tabla 20, los compuestos que presentan una coloración desde anaranjado a roja intensa (Figura 5), tienen esqueleto C3-C6-C3, ratificando de esta manera la presencia del componente difenilpropano como flavonoles para el subextracto de acetato de etilo.

TABLA 9-3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COLORIMÉTRICAS CON, SHINODA PARA LOS COMPUESTOS DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO. * MARCADOR FITOQUÍMICO

Compuesto N°	Rf	Coloración/ Resultado Prueba Colorimétrica Shinoda
1	0,038	Rojo
2	0,063	Rosado
3*	0,11	Rojo
4	0,16	Rojo
5	0,21	Anaranjado
6	0,33*	Rojo
7	0,40*	Amarillo
8	0,49*	Sin coloración
Interpretación de resultados: Shinoda coloración indicativa de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas(rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración. (Lock,O.,1994)		

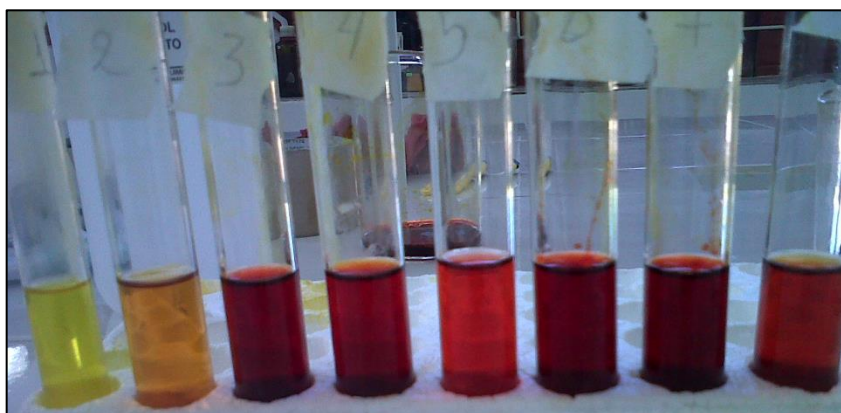


FIGURA 3-3. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE SHINODA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPONENTE FLAVÓNICO DE CADA COMPUESTO AISLADO DEL SUBEXTRACTO EN ACETATO DE ETILO. DE IZQUIERDA A DERECHA LOS COMPUESTOS: 1 AL 8. ESPOH, 2014

3.5.6 *Análisis por Espectroscopía ultravioleta-visible para cada compuesto*

Del subextracto en acetato de etilo se aislaron cada uno de los componentes flavónicos de los cuales se obtuvo su espectro de absorción UV- Visible en un rango de 200-400nm que se presentan del anexo 8 al 15. De todos los componentes analizados el

número 3 con un Rf de 0,11 presenta mayor absorción ultravioleta para el rango de fotoprotección, debido a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos de su estructura por lo que se lo considera como el *Marcador Fitoquímico* de la especie vegetal *Bidens andicola*.

TABLA 10-3. BANDAS CARACTERÍSTICAS PARA FLAVONOIDES

Tipo de Flavonoide	Longitud de onda	
	Banda I	Banda II
Funcionalidad cinamoílo	300-390nm	
Anillo aromático A(benzoilo)		250-280nm
Flavonas	310-350nm	
Flavonoles	350-385nm	
Flavonoles 3-O-sustituídos	330-360nm	

3.5.7 Caracterización de la estructura del esqueleto flavónico del marcador fitoquímico

Mediante un raspado de Sílica Gel realizado en placa preparativa 20 cm x 20 cm, y con el mismo sistema de solvente antes mencionado (ver figura 6) se aisló el marcador fitoquímico de la placa cromatográfica se lo reconstituyó con metanol absoluto y se filtró para el análisis espectrofotométrico UV-Visible (ver figura 7) por medio de reactivos de desplazamiento con AlCl₃ al 5% en metanol con y sin HCl concentrado, metóxido de sodio al 1% y Acetato de sodio al 5% en metanol, con el fin de evidenciar la presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula.

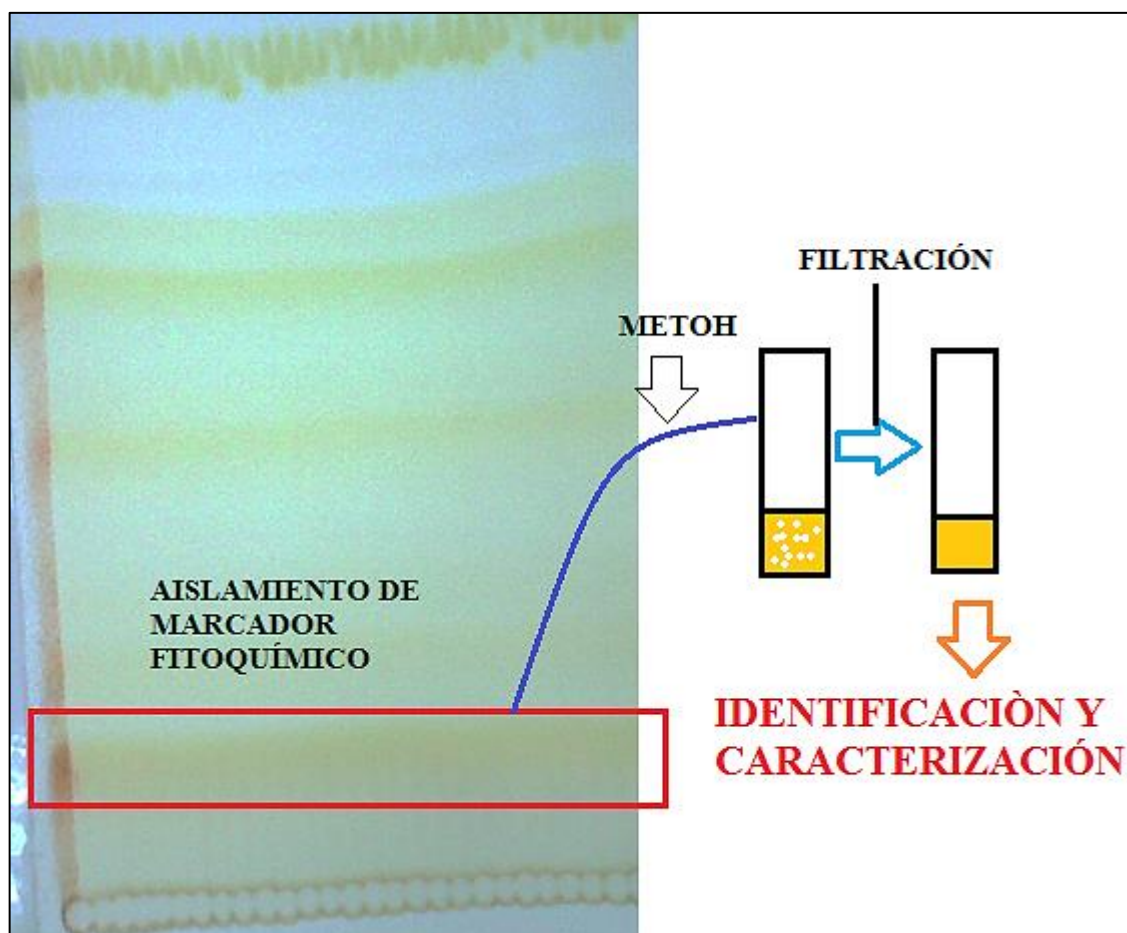


FIGURA 4-3. PLACA PREPARATIVA DE SILICA GEL, UTILIZADA PARA EL AISLAMIENTO CUANTITATIVO DEL MARCADOR FITOQUÍMICO. ESPOCH, 2014

FECHA:05/08/14

SERIE No:140113

ID :

HORA :15:15:16

OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN

VELOC:NORMAL

INT DATO:1.0nm

LIN BASE:USUARIO

ANCHOBANDA:2.0nm

CAMBIAR LAMP:325nm

SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	258.0	269.0	304.0	323.0	379.0					
ABS	0.418	0.486	0.273	0.292	0.459					

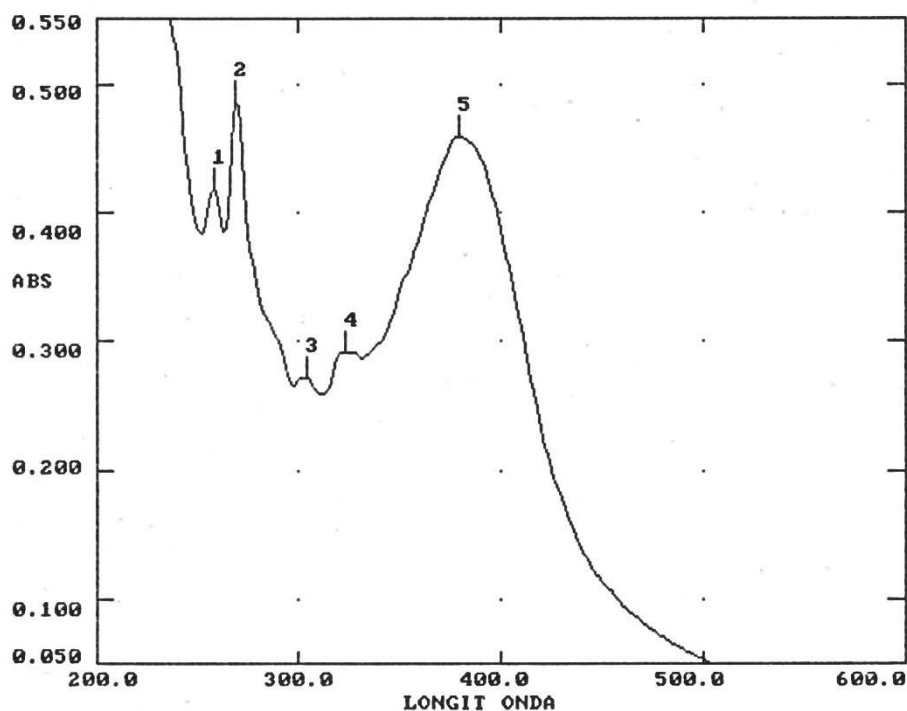


FIGURA 5-3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV DEL COMPUESTO FLAVÓNICO $R_f=0,11$ DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm EN METANOL. ESPOCH, 2014

La figura 8 y 9, nos muestra el espectro con $AlCl_3$ nos reveló que existe un desplazamiento batocrómico debido a la formación de quelatos con los flavonoides orto-hidroxilados, 3 y 5-hidroxilados, en medio ácido se mantiene el desplazamiento en la banda I comparándolo con el espectro metanólico lo que nos ratifica la presencia del flavonol 5-hidroxilado.

FECHA:05/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :15:24:10 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

		PICOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ_{nm}		256.0	269.0	300.0	321.0	377.0	509.0				
ABS		0.474	0.510	0.309	0.299	0.248	0.772				

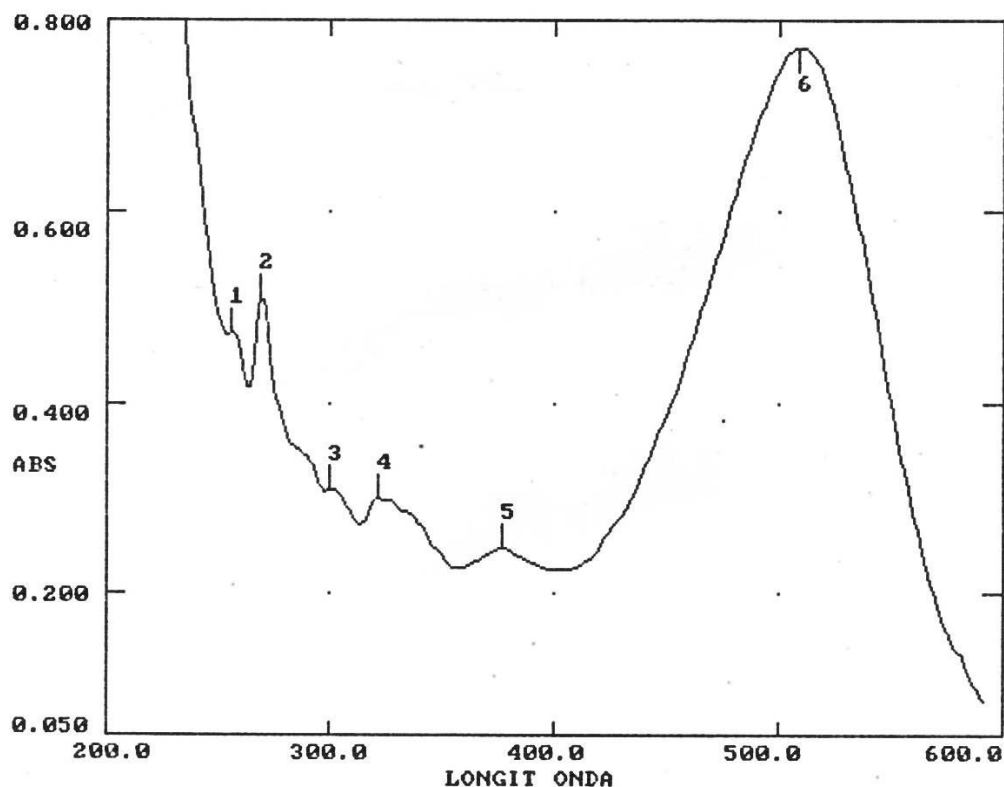


FIGURA 6-3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV DEL COMPUESTO FLAVÓNICO
Rf=0,11 DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag)
A 100ppm EN METANOL CON $AlCl_3$ SIN HCl. ESPOCH, 2014.

FECHA:05/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :15:29:34 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ_{nm}	257.0	269.0	305.0	327.0	349.0	433.0	582.0			
ABS	0.529	0.564	0.275	0.343	0.319	0.687	0.046			

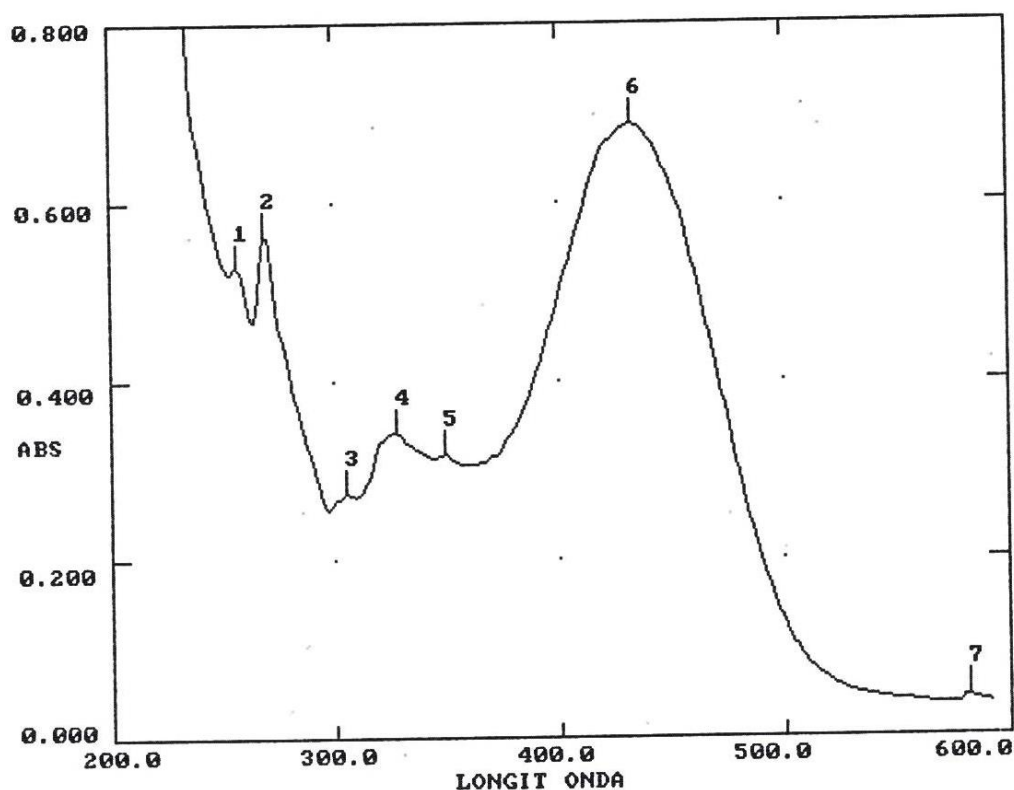


FIGURA 7-3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV DEL COMPUESTO FLAVÓNICO Rf=0,11 DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm EN METANOL CON AICI3 CON HCl. ESPOCH, 2014.

La lectura UV-Vis para el metanol muestra picos a 269nm y 379nm, al añadir NaOMe que es una base fuerte los hidroxilos fenólicos en posiciones 3 y 4` se ionizan y como se indica en la figura 10 ocurre un desplazamiento batocrómico de 65nm conservando la intensidad de la banda con lo que se confirma la presencia de flavonoles 3-O-sutituidos.

FECHA:05/08/14 SERIE No:140113 ID :
 HORA :15:43:24 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
 LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
 SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ nm	211.0	256.0	269.0	286.0	319.0	349.0	445.0	581.0	
ABS	2.886	0.812	0.698	0.569	0.348	0.333	0.470	0.115	

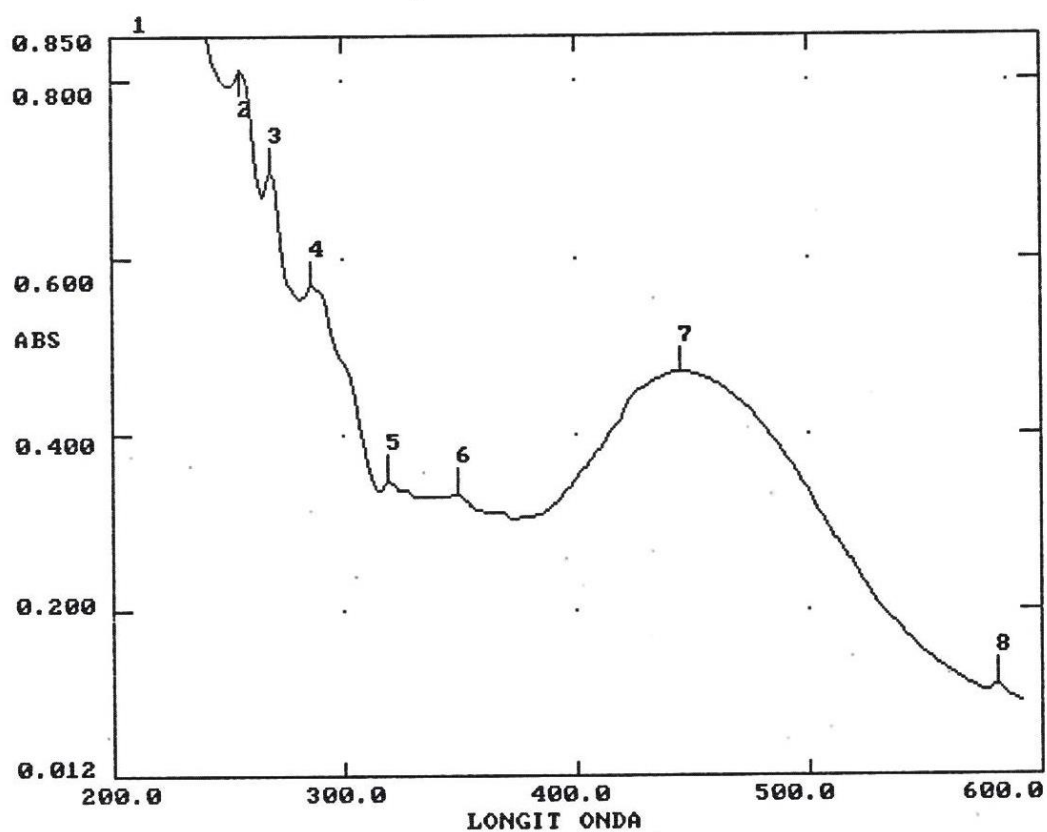


FIGURA 8-3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV DEL COMPUESTO FLAVÓNICO Rf=0,11 DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm CON METÓXIDO DE SODIO. ESPOCH, 2014.

El análisis con NaOAc ioniza hidroxilos fenólicos más ácidos como el que se encuentra en la posición 7, existe un desplazamiento batocrómico de 10nm confirmando la estructura del flavonol 7-hidroxilado. (Figura 11)

FECHA:05/08/14

SERIE No:140113

ID :

HORA :15:36:38

OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN

VELOC:NORMAL

INT DATO:1.0nm

LIN BASE:USUARIO

ANCHOBANDA:2.0nm

CAMBIAR LAMP:325nm

SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm 210.0	258.0	269.0	301.0	327.0	378.0	581.0			
ABS 2.638	0.631	0.665	0.340	0.341	0.473	0.053			

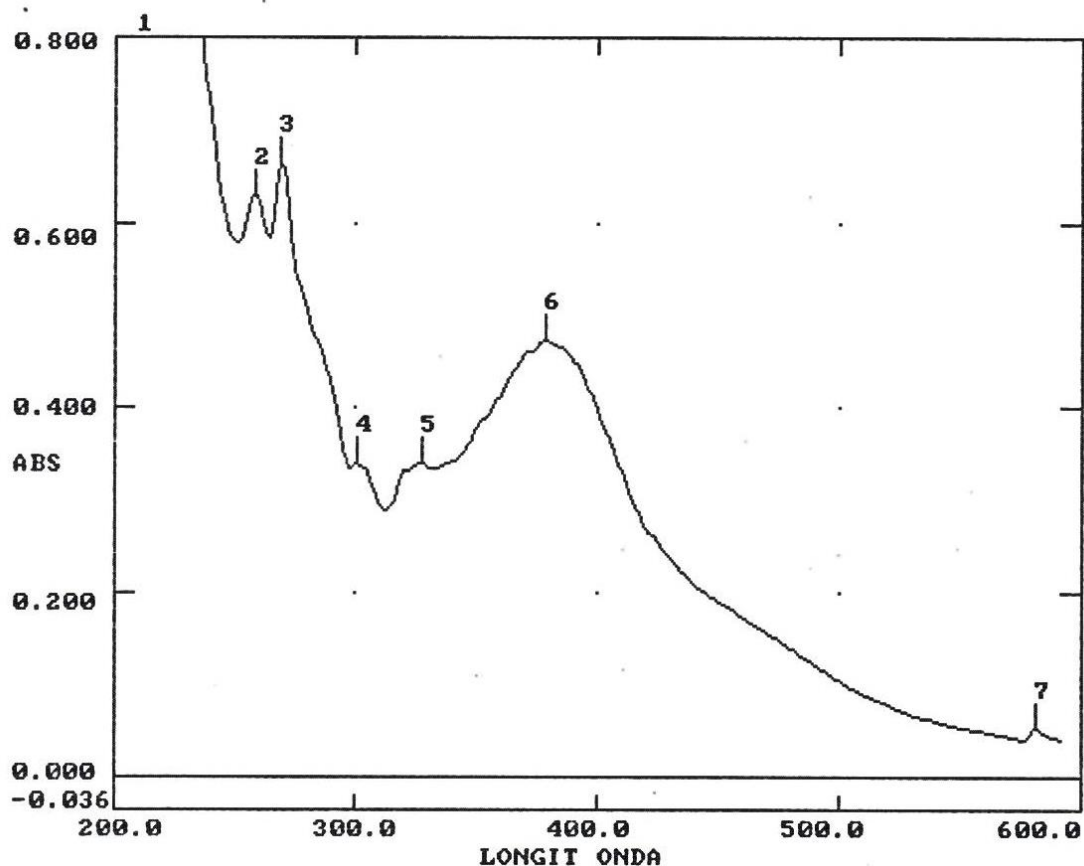


FIGURA 9-3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV DEL COMPUESTO FLAVÓNICO CON RF=0,11 DEL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm CON METÓXIDO DE SODIO. ESPOCH, 2014.

Con el análisis de las pruebas anteriormente descritas se confirma la estructura de un tipo de flavonoide correspondiente a la quercetina o su derivado quercetina éter 3-metilo que de acuerdo a estudios De Tommasi (1998) están presentes en *Bidens andicola*.

Mediante espectroscopia IR, como se muestra en la figura 12, los picos característicos corresponden a grupos funcionales como anillos aromáticos que se visualizan en una

frecuencia de tensión igual a $3150\text{-}3050\text{cm}^{-1}$ y en la región dactilar de 1400 a 1800 cm^{-1} correspondiente a la sustitución del mismo en posición para y meta, además de bandas de vibración características para grupos hidroxilos (baja intensidad), C=O DE 2000 A 2200 , C-H y C-C zona huella digital NIR 600 a 800 cm^{-1} , y de tensión del grupo O-H 3350 a 3500 cm^{-1} .

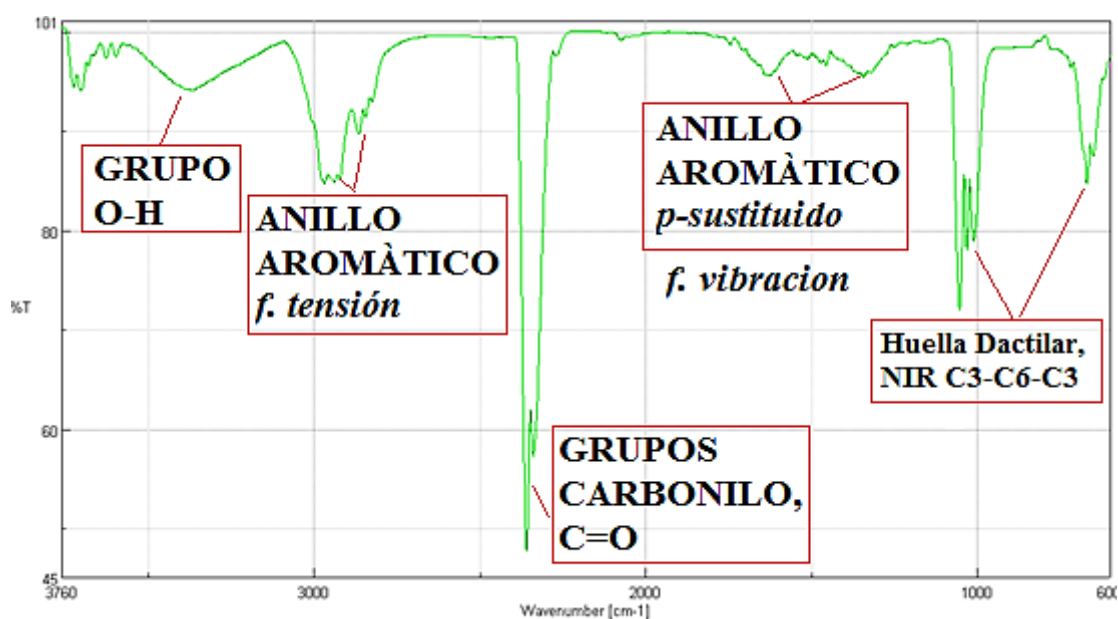


FIGURA 10-3. ESPECTRO IR, DEL MARCADOR FITOQUÍMICO, DONDE SE EVIDENCIA LA PRESENCIA DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS A GRUPOS FUNCIONALES TANTO EN VIBRACIÓN COMO EN TENSIÓN DE SUS ENLACES. ESPOCH, 2014

3.5.8 Estandarización del Marcador Fitoquímico

Para este ensayo se aisló cuantitativamente al marcador fitoquímico, según la técnica antes mencionada, con el compuesto aislado se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones y se determinó su absorbancia 379 nm como pico máximo de referencia. Para con la misma poder determinar la concentración del marcador en la especie vegetal.

TABLA 11-3. ABSORBANCIA A 379nm DEL ESTÁNDAR FLAVÓNICO DE *Bidens andicola*

Concentración del Estándar en ppm	Absorbancia 379 nm
100	0,089
50	0,05
10	0,025
1	0,014

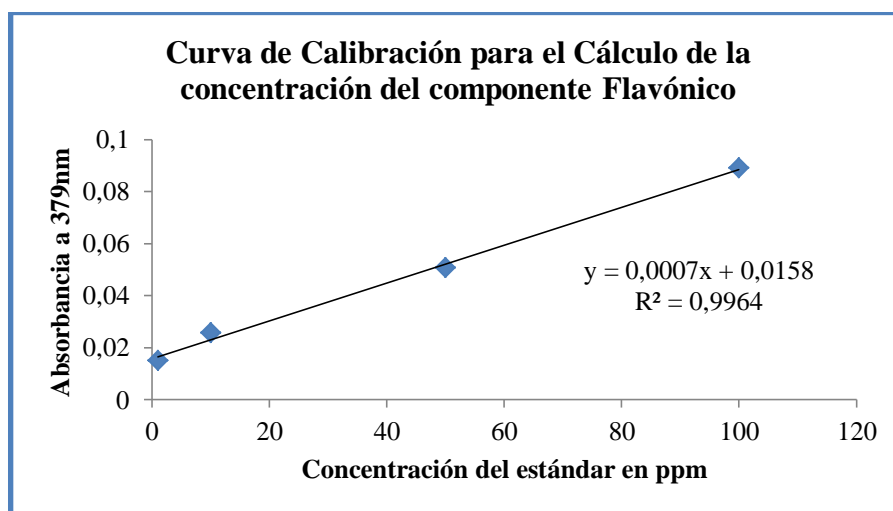


FIGURA 11-3. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MARCADOR FITOQUÍMICO. ESPOCH, 2014

El análisis por espectroscopia UV-Visible nos indicó que la absorbancia del subextracto en acetato de etilo es de 0,645nm, reemplazando en la ecuación que nos proporciona la curva de calibración (Figura 13) la concentración de flavonoides es de 901,24 ppm lo que corresponde tomando en cuenta el contenido de sólidos totales y humedad de la muestra una cantidad de 0,67% del marcador fitoquímico en las partes aéreas frescas.

3.5.9 Evaluación del Efecto protector contra la radiación ultravioleta UV-A inducida por muerte celular

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar el potencial efecto fotoprotector a nivel celular de los sub-extractos que presentaron un mayor espectro de absorción en el rango de 200 a 40 nm. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un test de ANOVA y prueba de homogeneidad de grupos de HSD de Tukey, previa verificación de la distribución normal de los datos con la prueba de homocedasticidad de Cochran y

Barlett. Se utilizó para este objetivo el software estadístico libre G-STAT v2.1. El análisis estadístico de la varianza al 95% de confianza, entre los grupos experimentales ensayados indica que existe diferencia en todos los grupos ($p\text{-value} = 7E-7$) y que de estos, el grupo blanco y control negativo son similares al igual que los grupos ensayados con sub-extracto etéreo y metanólico, siendo solo el grupo con sub-extracto en acetato de etilo el que presenta mayor citoprotección en comparación a todos los grupos, a nivel estadístico (ver anexo 16), esto se muestra gráficamente en la figura 14.

TABLA 12-3. GRUPOS DE ESTUDIO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR CONTRA LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA UV-A INDUCIDA POR MUERTE CELULAR

FACTOR	UFC/ml
Blanco (agua peptonada)	$1,7 \pm 0,23 \times 10^4$
Control negativo (Metanol+ agua peptonada)	$0,4 \pm 0,09 \times 10^4$
Subextracto Etéreo	$1,1 \pm 0,20 \times 10^5$
Subextracto Acetato de Etilo	$1,9 \pm 0,17 \times 10^5$
Subextracto Metanol	$1,0 \pm 0,15 \times 10^5$

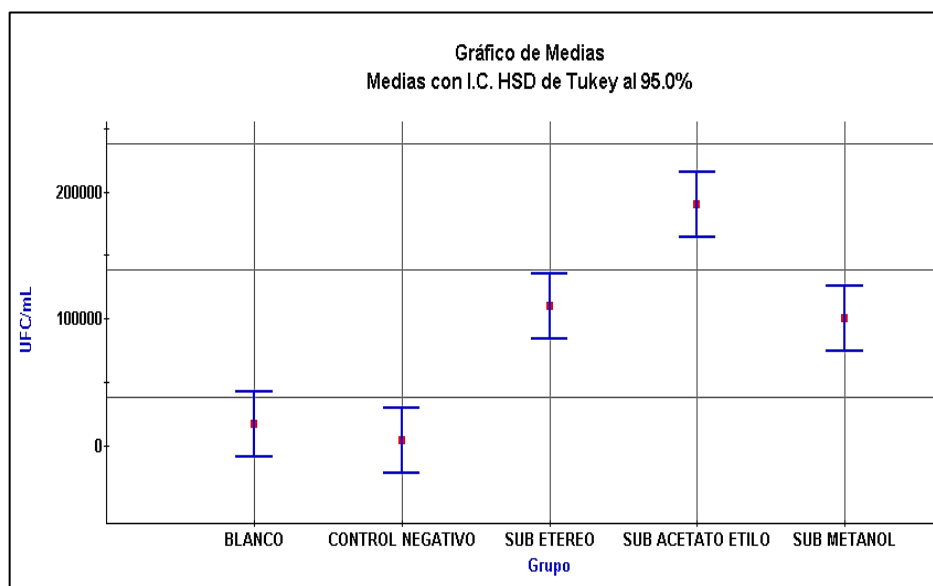


FIGURA 12-3. GRÁFICA DE ANOVA-HSD TUKEY AL 95% DE CONFIANZA ESTADÍSTICA PARA EL ENSAYO DE CITO-PROTECCIÓN SOBRE *E.coli*. ESPOCH, 2014

3.5.9.1 Determinación del Factor de Protección Solar UV-B

El Factor de Protección Solar calculado mediante la ecuación de Mansur y comparado posteriormente por el test-de-student para muestras dependientes, entre el subextracto de acetato de etilo y el marcador fitoquímico de *Bidens andicola* es de $20,05 \pm 1,85$, y $11,62 \pm 2,09$ respectivamente, lo cual nos indica que la protección brindada por el componente flavónico total frente a la radiación ultravioleta es estadísticamente superior (p-value = 0,0064) comparándolo frente al marcador fitoquímico, al 95% de confianza estadística (Ver Anexo 17) lo que significa que para llegar a la fotoprotección que nos brinda el componente flavónico total tendríamos que duplicar la concentración del marcador fitoquímico.

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

TABLA 13-3. CÁLCULO DEL FPS PARA EL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Bidens andicola*

Absorción UV-B Subextracto Acetato de Etilo							
	nm	A1	A2	A3	A PROM.	EExI	FPS
1	290	3,121	3,134	3,132	3,129	0,015	0,05
2	295	2,694	2,698	2,695	2,696	0,0817	0,22
3	300	2,207	2,206	2,207	2,207	0,2874	0,63
4	305	1,844	1,847	1,845	1,845	0,3278	0,60
5	310	1,74	1,739	1,74	1,740	0,1864	0,32
6	315	1,753	1,75	1,75	1,751	0,0839	0,15
7	320	1,555	1,556	1,555	1,555	0,018	0,03
FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR							20,05±1,85

TABLA 14-3. CÁLCULO DEL FPS DEL MARCADOR FLAVÓNICO AISLADO DE *Bidens andicola*

Absorción UV-B Marcador flavónico aislado							
	nm	A1	A2	A3	A PROM.	EExI	FPS
1	290	2,501	2,503	2,505	2,503	0,015	0,038
2	295	1,838	1,841	1,839	1,839	0,082	0,150
3	300	1,378	1,378	1,378	1,378	0,287	0,396
4	305	1,049	1,049	1,048	1,049	0,328	0,344

5	310	0,859	0,86	0,86	0,860	0,186	0,160
6	315	0,749	0,749	0,749	0,749	0,084	0,063
7	320	0,652	0,652	0,653	0,652	0,018	0,012
FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR							11,62±2,09

3.5.10 Evaluación de la citotoxicidad en *Artemia salina*

Se evaluó la dosis letal media del sub-extracto de acetato de etilo y el marcador fitoquímico mediante un ensayo in-vitro con *Artemia salina*, aplicando la fórmula que a continuación se detalla:

$$\text{Log CL}_{50} = \log X_1 + \frac{50-Y_1}{Y_2-Y_1} [\log(X_2)] - [\log(X_1)]$$

Donde

X₁: Concentración inhibición Y₁ > 50%

X₂: Concentración inhibición Y₂ < 50%

La tabla 26 y 27 muestran los resultados obtenidos para el subextracto de acetato de etilo y el marcadores, siendo la CL₅₀ para el subextracto igual a de 204,48ppm, y la del marcador fitoquímico correspondiente a la estructura flavónica de la quercetina o su derivado es de 1224,74ppm lo que nos indica que sus categorías de toxicidad son de moderadamente tóxico y no tóxico respectivamente. Los datos fueron comparados a nivel estadístico mediante una prueba de T-Student para muestras dependientes y se encuentran que ambas dosis son diferentes (p-value = 0,0058) a un 95% de confianza estadística y que para obtener un mejor resultado en la elaboración de un fotoprotector natural a base de *Bidens andicola*, es necesario no superar los 100 ppm de concentración

TABLA 15-3. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD EN *Artemia salina*- SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

FACTORES		VARIABLES DE RESPUESTA				
		NV	NM	L	C	CL ₅₀
1	GB	8	2	20%		
2	10ppm	9	1	10%		
3	100ppm	9	1	10%		
4	500ppm	0	10	100%	Moderadamente tóxico	204,48±59,65
5	1000ppm	0	10	100%		

6	1500ppm	0	10	100%
GB: GRUPO BLANCO (Agua de mar), GC (-): GRUPO CONTROL (-), NIVELES: Concentración de marcador flavónico (ppm), NM: Número de muertos, NV: Número de vivos, L: Letalidad en %, C: Categoría de toxicidad.				

TABLA 16-3. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD EN *Artemia salina*- MARCADOR FLAVÓNICO

FACTORES		VARIABLES DE RESPUESTA				
		NV	NM	L	C	CL ₅₀
1	GB	9	1	10%		
2	10ppm	10	0	0%		
3	100ppm	10	0	0%		
4	250ppm	10	0	0%		
5	500ppm	9	1	10%		
6	1000ppm	6	4	40%	No tóxico	1224,74±273,78
7	1500ppm	4	6	60%		
GB: GRUPO BLANCO(Agua de mar), GC (-): GRUPO CONTROL (-), NIVELES: Concentración de marcador flavónico (ppm), NM:Número de muertos, NV: Número de vivos, L: Letalidad en %, C: Categoría de toxicidad.						

CONCLUSIONES

1. En la presente investigación se determinó cualitativa y cuantitativamente al marcador fitoquímico del componente flavónico de *Bidens andicola*, siendo el mismo un isoflavonol, correspondiente a un derivado de la quercetina, cuya concentración en las partes aéreas frescas de la planta es de 0,67% (m/m).
2. El marcador fitoquímico fue caracterizado, mediante pruebas colorimétricas (Shinoda), y espectroscópicas UV-IR. Cuyo esqueleto flavónico presenta orto-hidroxilación 3 y 5 además una 3-O-sutitución, 7-hidroxilación. Sus grupos funcionales, arilo, fenol, cetona fueron reconocidos en la zona del infrarrojo en frecuencias de vibración y de tensión.
3. La actividad fotoprotectora in-vitro del componente flavónico y del marcador fitoquímico de *Bidens andicola* (Ñachag) fue evaluada, mediante métodos in-vitro-in-silico, utilizando la espectroscopía UV y la ecuación de Mansur. Así el componente flavónico presenta un FPS de 20 y el marcador fitoquímico de 11. Convirtiéndose en potenciales candidatos para la elaboración de protectores solares naturales.
4. Con la determinación de la CL₅₀ se concluye que el componente flavónico y el marcador fitoquímico de *Bidens andicola* (Ñachag), son de moderadamente tóxico a no tóxico respectivamente. Es así que la concentración segura para la utilización de los mismos en posteriores ensayos debería ser menor a la mitad de la CL₅₀ calculada.

RECOMENDACIONES

1. Impulsar el estudio farmacognóstico y fitoquímico de especies prominentes con potencial actividad fotoprotectora del Ecuador y especialmente del género *Bidens*.
2. Promover el rescate de los saberes ancestrales de especies vegetales nativas de la zona 3 del Ecuador.
3. Profundizar los estudios farmacológicos, sobre actividades antihistamínica, antioxidante, antiinflamatoria y anticolerética de la especie vegetal *Bidens andicola* con el fin de promover el uso y sostenibilidad de la misma.
4. Fortalecer el desarrollo fitofarmacéutico y fitocosmecéutico a nivel industrial del componente flavónico de *Bidens andicola*.
5. Fomentar el uso de protectores solares a base de componentes naturales, para disminuir el impacto ambiental y socioeconómico que provocan los fotoprotectores convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. (Archives of biochemistry and biophysics). Vol. 508, N° 2. 2011-04-15, EE.UU, pp. 144-151.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986110005035>

2014-07-18

AVILA, J., et al. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. (Fitoterapia). Vol. 76, N° 3. 2005-06-03, México, pp. 301-309.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535>

2014-05-20

BISSETT, D., et al. Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UVB-irradiated hairless mouse skin. (Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology). Vol. 9, N° 3. 1991-06-01. España, pp. 323-334

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449180169I>

2014-06-24

CHATELAIN, E., et al. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters. (Skin Pharmacology and Physiology). Vol. 16, N°1. 2003-05-27. Suiza, pp. 28-35

[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/SKINPEN_UVFILTER-](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/SKINPEN_UVFILTER-Chatelain2003.pdf)

[Chatelain2003.pdf](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/SKINPEN_UVFILTER-Chatelain2003.pdf)

2014-06-16

CUTIPA, CH. Contribución al estudio fitoquímico de la *Bidens andicola*. (Revista de Química). Vol. 5, N° 2. 1991-12-20, Italia, pp. 121-123.

<http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/4628/4628>

2014-07-08

DELICONSTANTINOS, G. et al. Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. (Experimental physiology). Vol. 81, N° 6. 1996-09-01, EE.UU, pp. 1021-1033

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/expphysiol.1996.sp003986/abstract>

2014-06-28

DE TOMMASI, N., et al. Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens andicola*. (Journal of natural products). Vol. 61, N° 8, 1998-10-03, Italia, pp. 973-977.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np970470f>

2014-05-01

DOMÍNGUEZ, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. 2ª ed, Monterrey-México. Limusa. 1979, pp.81-88

DUTRA, E., et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. (Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas). Vol.40, N° 3. 2004-09-28, Brasil, pp. 381-385

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151693322004000300014&script=sci_arttext

2014-07-29

ECUADOR. AGENCIA ESPACIAL CIVIL ECUATORIANA (EXA). Informe HIPERIÓN. Quito- Ecuador. EXA. 2008

http://www.exa.ec/INFORME-HIPERION_files/INFORME-HIPERION.pdf

2014-05-20

ECUADOR. Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA). Cáncer de piel. Quito-Ecuador. SOLCA. 2005.

<http://www.solcaquito.org.ec/index.php/en/el-cancer/tipos-de-cancer/cancer-de-piel>

2014-05-20

ELMETS, C., et al. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. (Journal of the American Academy of Dermatology). Vol. 44, N°3. 2001-03-14, España, pp. 425-432.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962201154630>

2014-06-20

FERREIRA, T. Considerations on photoprotection and skin disorders. (Annales de dermatologie et de vénéréologie). Vol. 5, N° 139. 2012-09-03, España, pp. 135-143

http://www.sciencedirect.com/science/article/ac.elscdn.com_S0151963812701254_1-s2.0-S0151963812701254-main

2014-07-24

F'GUYER, S. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. (Photodermatology, photoimmunology & photomedicine). Vol. 19, N° 2. 2003-04-24, EE.UU, pp. 56-72.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0781.2003.00019.x/pdf>

2014-06-12

FIGUEIREDO, S., et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. (Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology). Vol. 131, N° 134. 2014-0-17, pp. 65-73

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000050>

2014-06-20

GILABERTE, Y., et al. Novedades en fotoprotección. (Actas Dermo-Sifiliográficas). Vol. 101, N° 8. 2010-08-13, España, pp. 659-672

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001731010002760>

2014-06-21

HUMAN, S., et al. Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum*(canela). (Revista Horizonte Médico). Vol.40, N°23. 2003-12-01, Perú, 69-76

[http://portal.revistas.bvs.br/index.php?search=Horiz.%20m%E9d.%20\(Impresa\)&connector=ET&lang=pt](http://portal.revistas.bvs.br/index.php?search=Horiz.%20m%E9d.%20(Impresa)&connector=ET&lang=pt)

2014-07-10

HUPEL, M. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. (Talanta). Vol. 86, N° 21. 2011-10-30, EE. UU, pp. 362-371.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011008344>

2014-06-21

KULLAVANIJAYA, P. Photoprotection. (American Academy of Dermatology, Inc.). Vol. 52, N° 6. 2005-03-18, EE.UU, pp. 937-951

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962204022674>

2014-06-01

LOCK, O. Investigación Fitoquímica. 2^a ed., Lima-Perú. Fondo. 1994, 111-150

MANSUR, J., et al. Determinacao do factor de protecao solar por espectrofotometría. (Anais Brasileiros de Dermatologia). Vol. 61, N° 23. 1986-10-23, Brasil, pp. 121-124.

<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n4/a23v17n4.pdf>

2014-06-12

MUJWAH, A., et al. First isolation of a flavonoid from *Juniperus procera* using ethyl acetate extract. (Arabian Journal of Chemistry). Vol. 3, N° 2, 2010-02-10, Sudán, pp. 85-88.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210000146>

2014-06-28

NASH, J., Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. (Dermatologic clinics), Vol. 24, Nº 1. 2006-09-20, EE.UU, pp. 35-51.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863505001129>

2014-06-23

NICHOLS, J. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. (Archives of dermatological research). Vol. 302, Nº 2. 2009-09-07, pp. 71-83.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00403-009-1001-3>

2014-06-20

ORDÓÑEZ, V. Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon. (Dry Forest Conservation: Ethnobotany and Forest Use). Vol. 10, Nº 2. 2006-03-05, EE.UU, pp. 123-128

http://www.lyona.org/articles/volume_22/volume.pdf

2014-06-20

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Índice UV solar mundial guía práctica. 2003. pp 1-20

<http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>

2014-05-24

RODRIGUEZ, M. Cosmetología de Harry. Madrid-España. Díaz de Santos. 1990, pp. 29-49

SAIJA, A., et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. (International Journal of Pharmaceutics). Vol. 199, Nº 1. 2000-01-04, Italia, pp. 39-47.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300003586>

2014-05-13

SAMBANDAN, D. Sunscreens: an overview and update. (Journal of the American Academy of Dermatology). Vol. 64, N° 4. 2011-04-15, New York-EE.UU, pp. 748-758.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962210000228>

2014-06-23

SEITÉ, S., et al. Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review. (British Journal of Dermatology), Vol. 163, N° 5. 2010-10-06, Londres, pp. 903-914.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2010.10018.x/pdf>

2014-06-20

SHARAPIN, S. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Bogotá-Colombia. Quebecor-Impreandes. 2000, pp. 35-40

SKLAR, L., et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. (Photochemical & Photobiological Science). Vol. 12, N° 1. 2012-10-30, EE.UU, pp. 54-64.

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/pp/c2pp25152c/unauth>

2014-05-23

STEVANATO, R., Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. (Regulatory Toxicology and Pharmacology). Vol. 69, N° 1. 2014-03-05, Italia, pp. 71-77

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230014000385>

2014-05-30

WALLS, A., et al. Host Risk Factors, Ultraviolet Index of Residence, and Incident Malignant Melanoma In Situ Among US Women and Men. (American journal of epidemiology). Vol. 177, N° 9. 2013-09-21, EE.UU, pp. 997-1005

<http://aje.oxfordjournals.org/content/early/2013/04/10/aje.kws335.short>

2014-06-12

WLASCHEK, M., et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. (Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology). Vol. 63, N° 1. 2001-10-10, EE.UU, pp. 41-51

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401002019>

2014-07-10

ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO HEXÁNICO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm

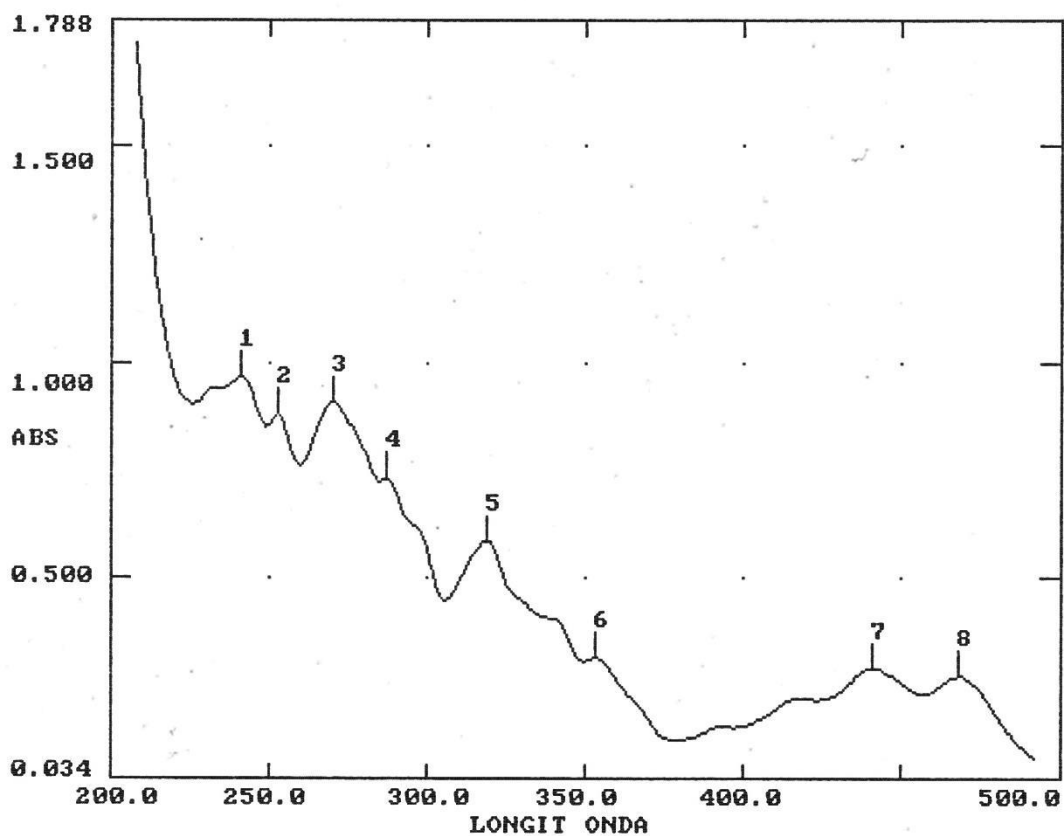
HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:17/07/14 SERIE No:140113 ID :

HORA :17:07:16 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	10
λnm	241.0	253.0	270.0	287.0	319.0	353.0	441.0	468.0	
ABS	0.966	0.880	0.910	0.731	0.588	0.315	0.291	0.273	



ANEXO 2. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO ETÉREO *Bidens*
andicola (Ñachag) A 100ppm

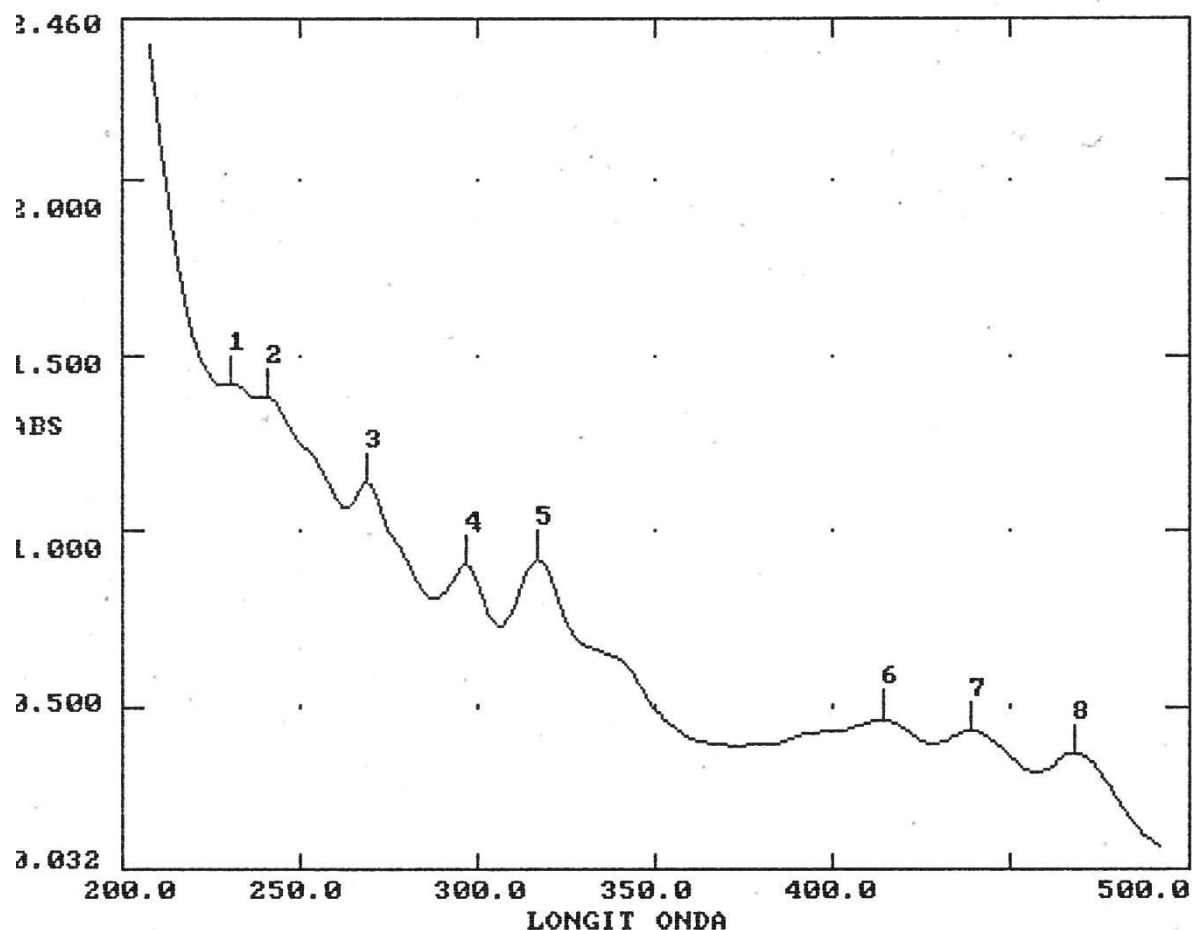
HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:17/07/14 SERIE No:140113 ID :
 HORA :17:09:58 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
 LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
 SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nm 231.0	241.0	269.0	297.0	317.0	414.0	439.0	468.0		
ABS 1.420	1.384	1.137	0.904	0.918	0.463	0.432	0.368		



ANEXO 3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO EN ACETATO

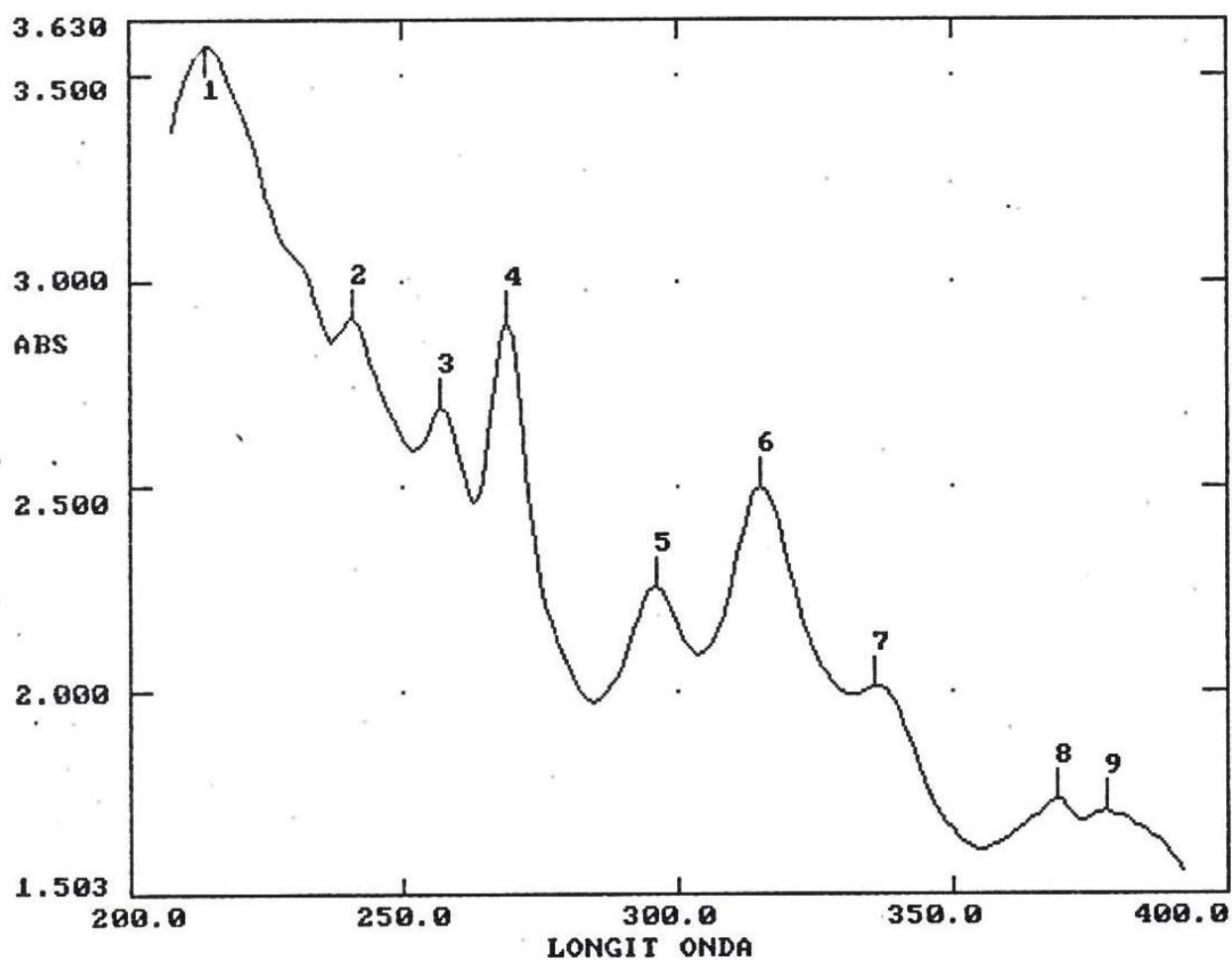
DE ETILO DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm

TIPO BARR:INTELIGEN
LIN BASE:USUARIO
SUAVIZANDO: MEDIO

VELOC:NORMAL
ANCHOBANDA:2.0nm

INT DATO:1.0nm
CAMBIAR LAMP:325nm

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	214.0	241.0	257.0	269.0	296.0	315.0	336.0	369.0	378.0	
ABS	3.571	2.908	2.690	2.901	2.257	2.501	2.013	1.736	1.708	



ANEXO 4. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO EN MEZCLA
 AZEOTRÓPICA DE ACETATO DE ETILO- ETANOL (70-30) DE *Bidens andicola*
 (Ñachag) A 100ppm

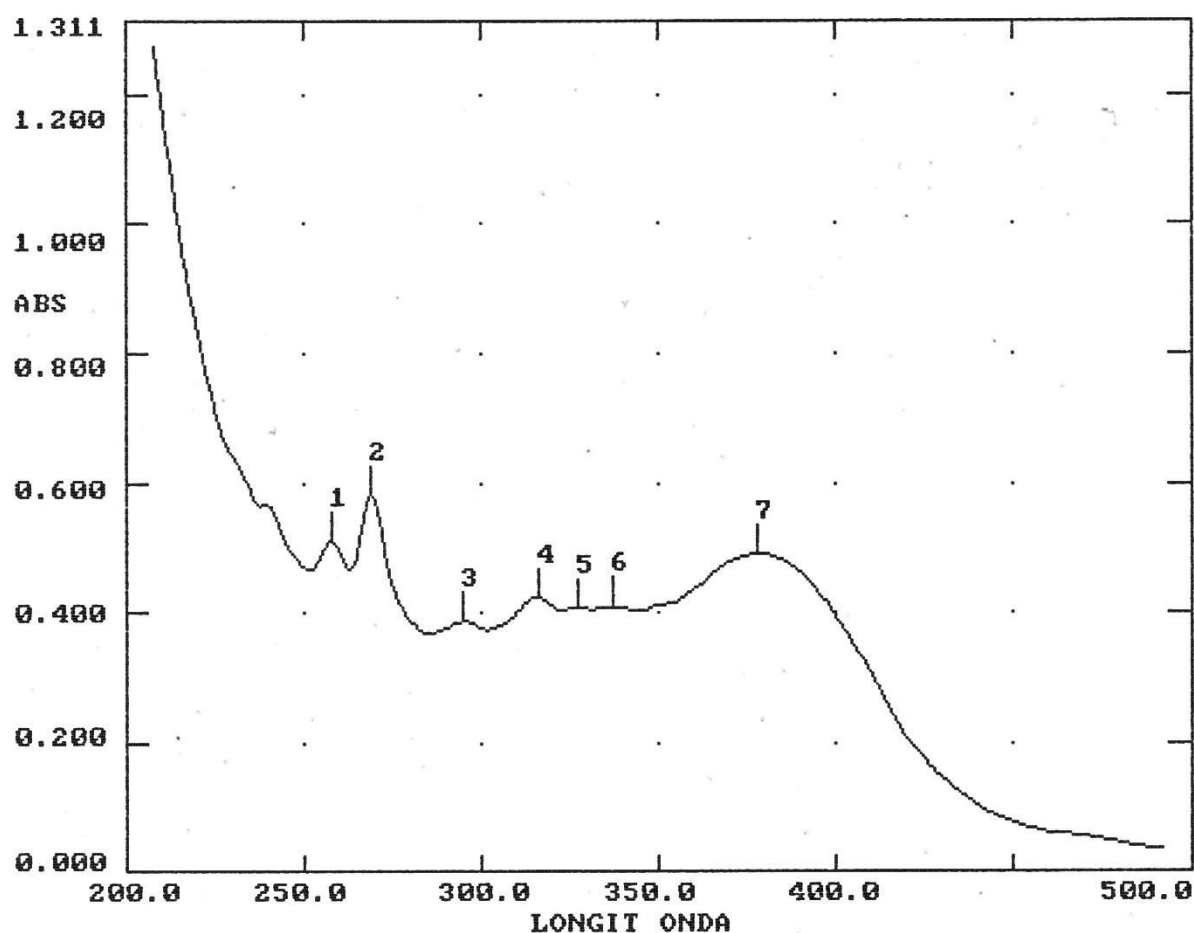
HELIOS β ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:17/07/14 SERIE No:140113 ID :
 HORA :17:21:42 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
 LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
 SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ nm	258.0	269.0	295.0	316.0	327.0	337.0	378.0			
ABS	0.510	0.582	0.388	0.425	0.410	0.411	0.493			



ANEXO 5. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO EN MEZCLA
AZEOTRÓPICA DE ÉTER-ETANOL (60-40) DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm

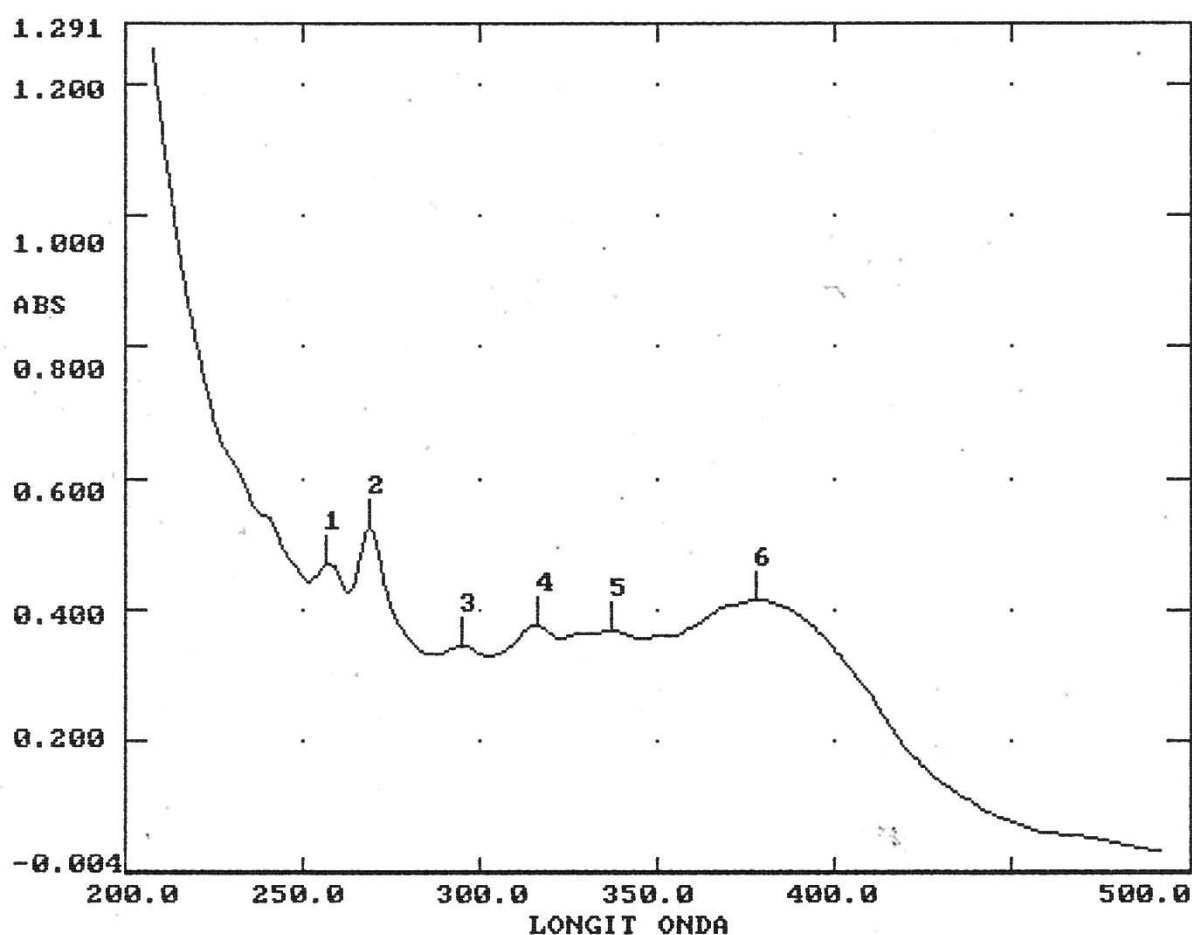
HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:17/07/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :17:27:40 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	257.0	269.0	295.0	316.0	337.0	378.0				
ABS	0.471	0.524	0.347	0.377	0.369	0.416				



ANEXO 6. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO ETANÓLICO DE
Bidens andicola (Ñachag) A 100ppm

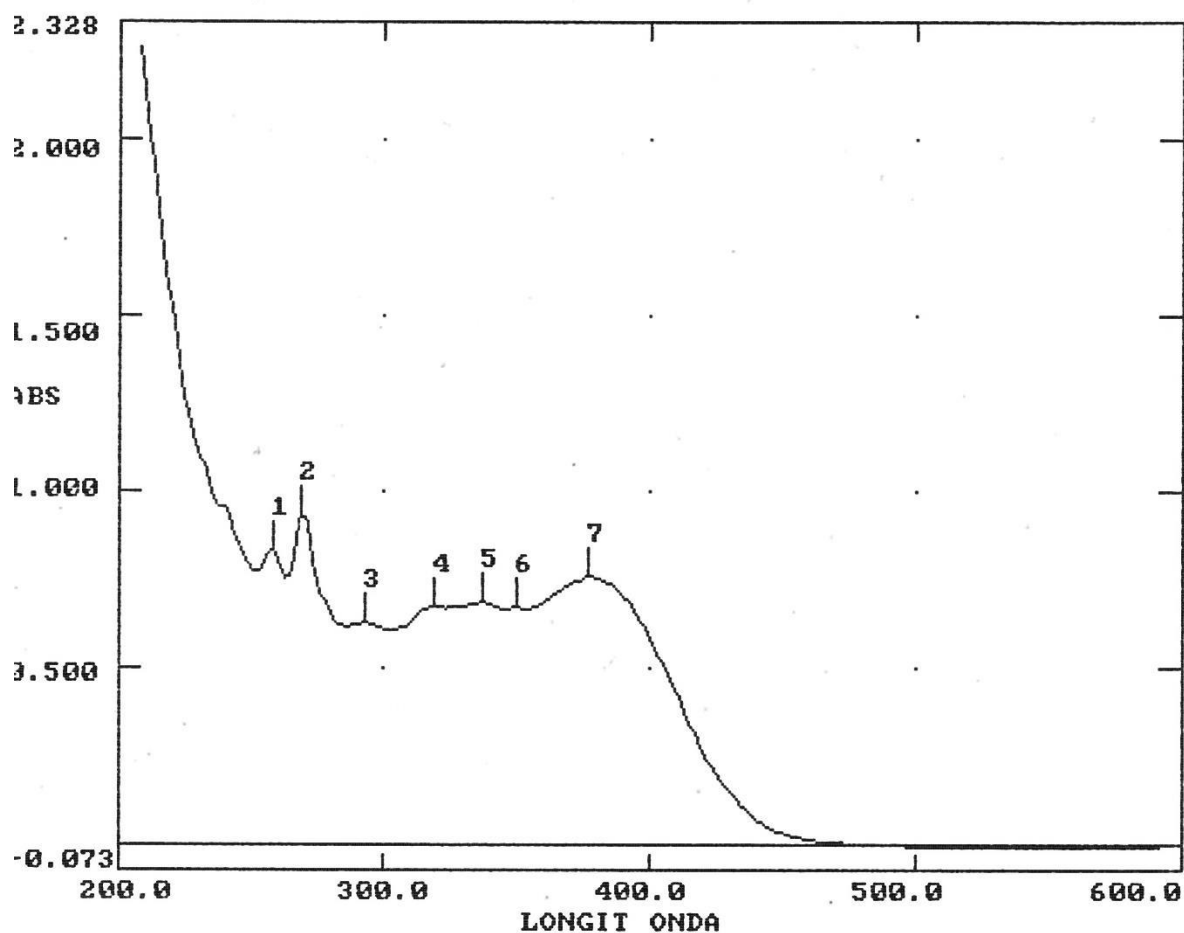
HELIOS β ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:28/07/14 SERIE No:140113 ID :
 HORA :15:29:04 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
 LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
 SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ_{nm} 258.0	269.0	293.0	319.0	337.0	350.0	377.0			
ABS 0.831	0.933	0.631	0.677	0.687	0.674	0.761			



ANEXO 7. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS SUBEXTRACTO METANÓLICO
DE *Bidens andicola* (Ñachag) A 100ppm

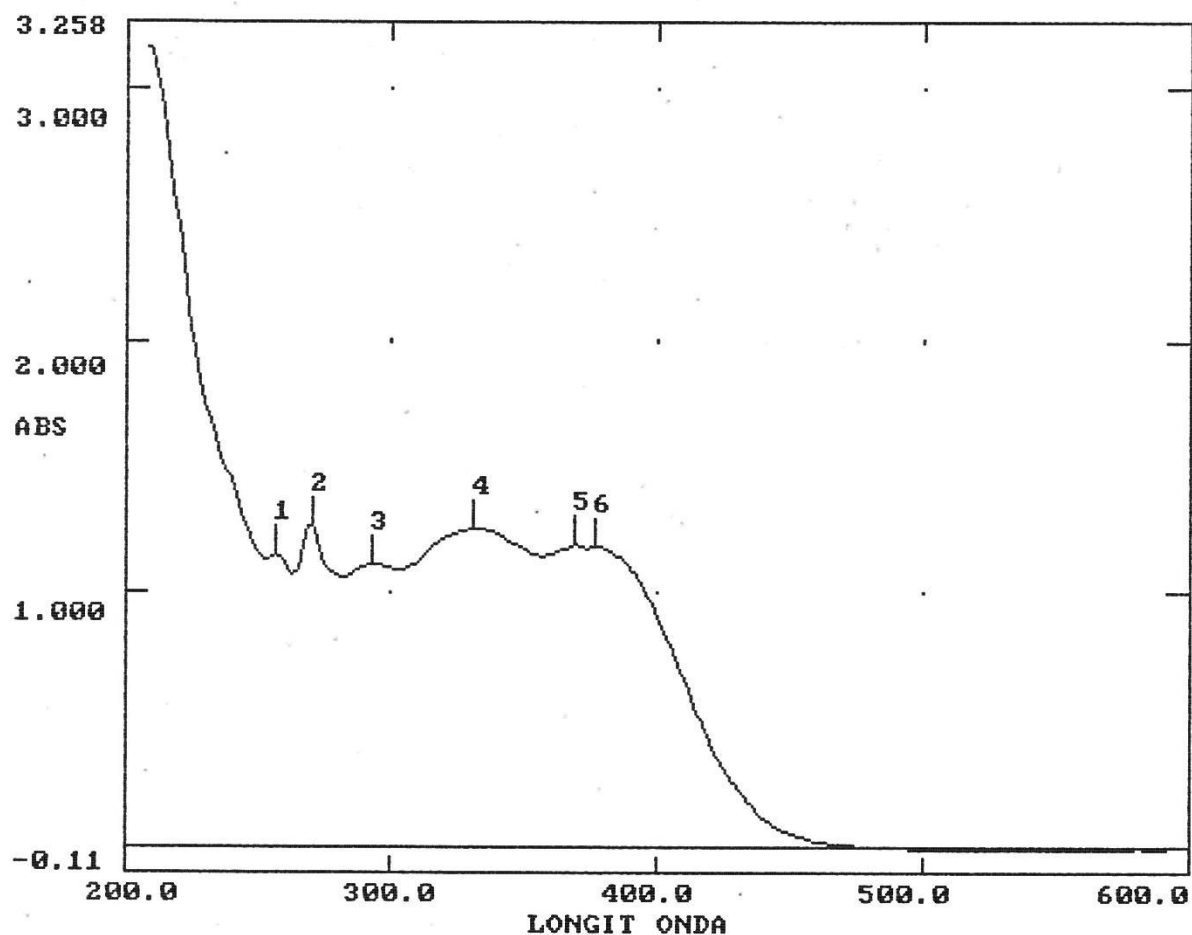
HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:28/07/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :15:34:46 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm 257.0	270.0	293.0	331.0	369.0	377.0				
ABS 1.148	1.263	1.116	1.252	1.191	1.184				



**ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE COMPUESTOS ENCONTRADOS
EN EL SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO De *Bidens andicola* (Ñachag)
A 100ppm**

ANEXO 8. COMPUESTO 1

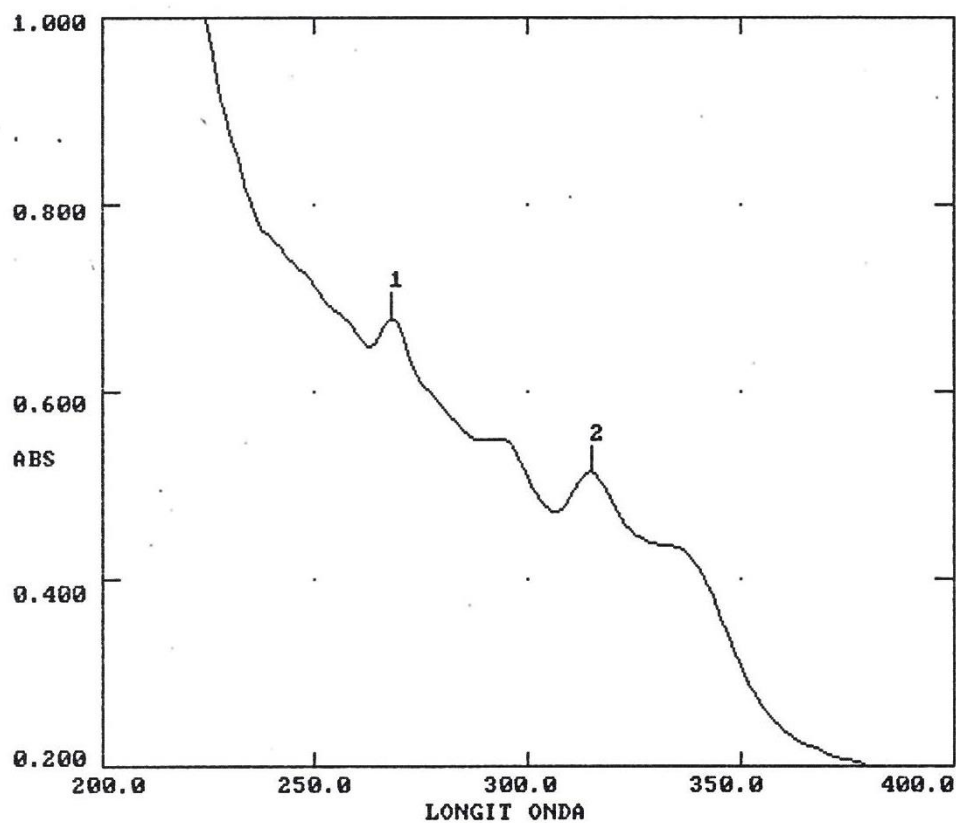
HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :12:15:30 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm 268.0	315.0								
ABS 0.680	0.516								



ANEXO 9. COMPUESTO 2

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

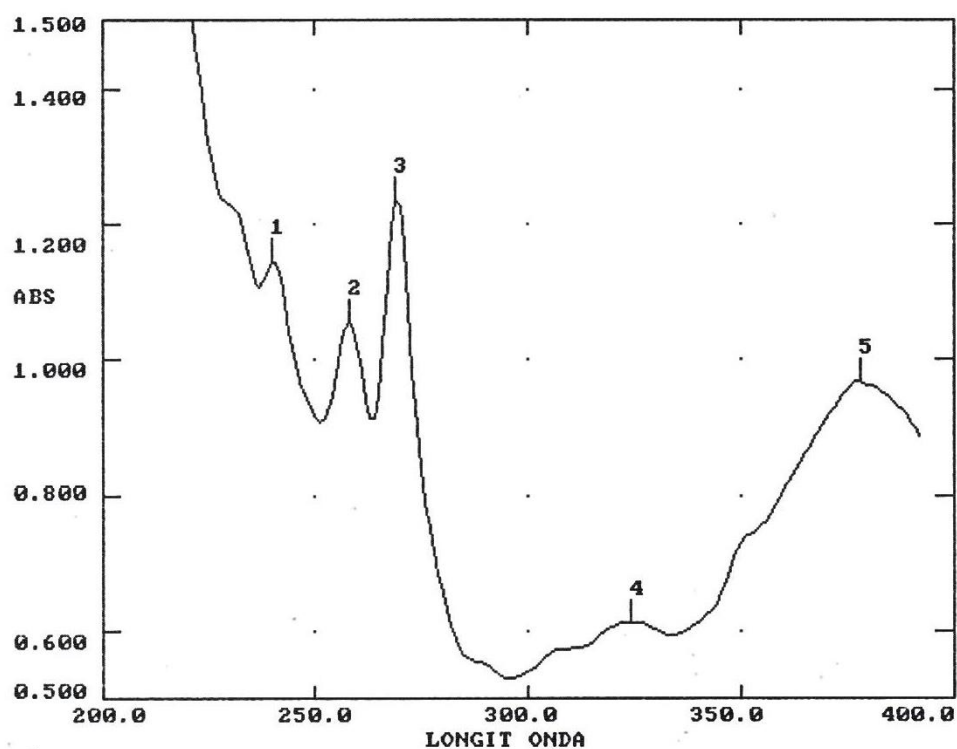
PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :

HORA :12:23:42 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	240.0	258.0	269.0	324.0	378.0					
ABS	1.146	1.054	1.238	0.614	0.968					



ANEXO 101. COMPUESTO 3

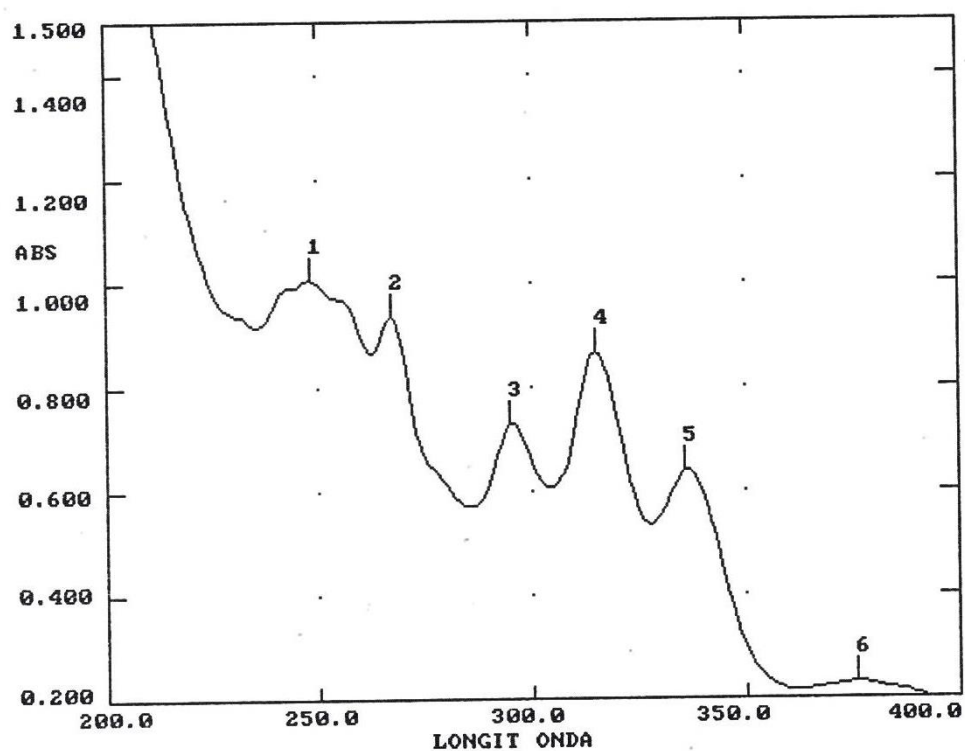
HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :12:31:32 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

		PICOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm		248.0	267.0	295.0	315.0	336.0	376.0				
ABS		1.007	0.939	0.731	0.869	0.640	0.233				



ANEXO 11. COMPUESTO 4

HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

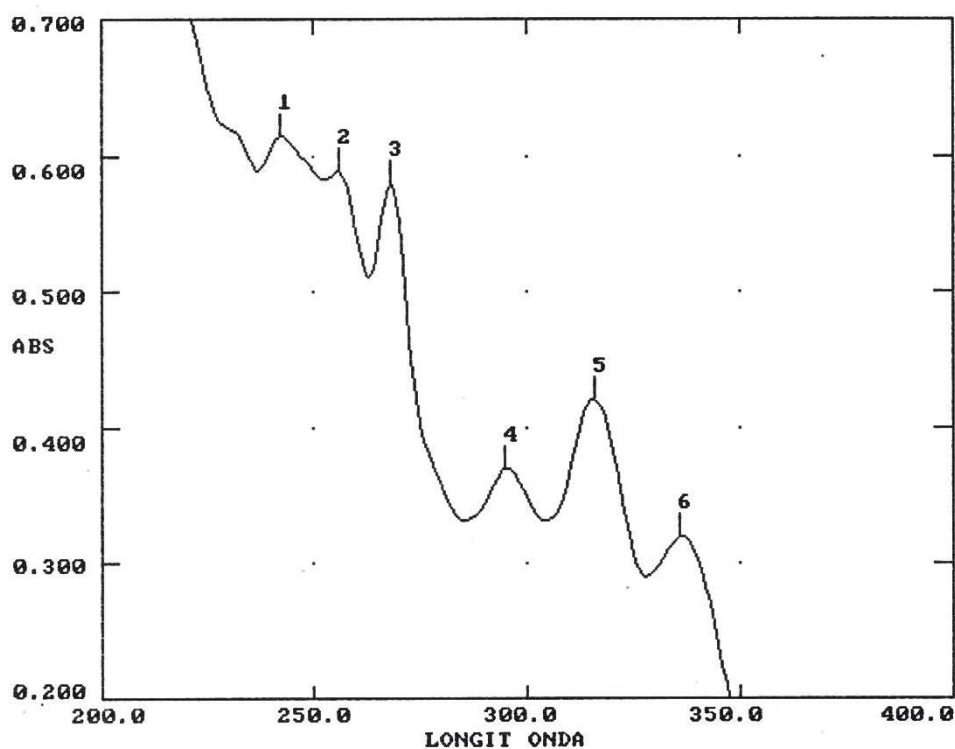
FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :

HORA :12:36:08 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

PICOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	242.0	256.0	268.0	295.0	316.0	336.0				
ABS	0.616	0.589	0.581	0.370	0.421	0.319				



ANEXO 12. COMPUESTO 5

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:01/08/14

SERIE No:140113

ID :

HORA :12:40:00

OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN

VELOC:NORMAL

INT DATO:1.0nm

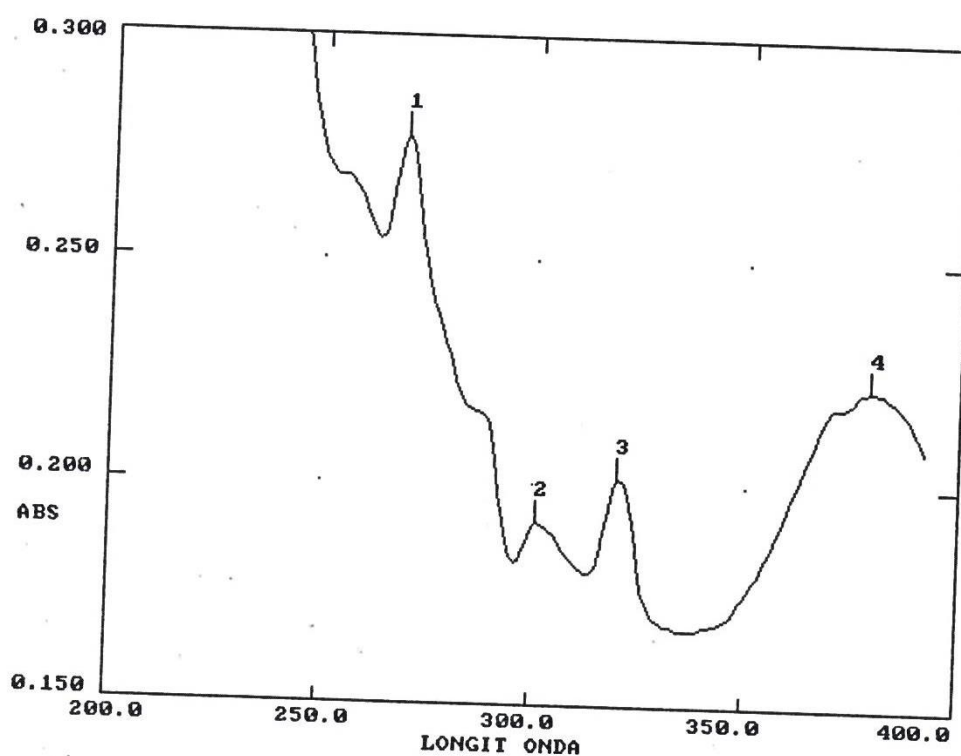
LIN BASE:USUARIO

ANCHOBANDA:2.0nm

CAMBIAR LAMP:325nm

SUAUIZANDO: MEDIO

	1	2	3	4	PICOS					
λnm	269.0	301.0	320.0	379.0	5	6	7	8	9	10
ABS	0.278	0.191	0.201	0.222						



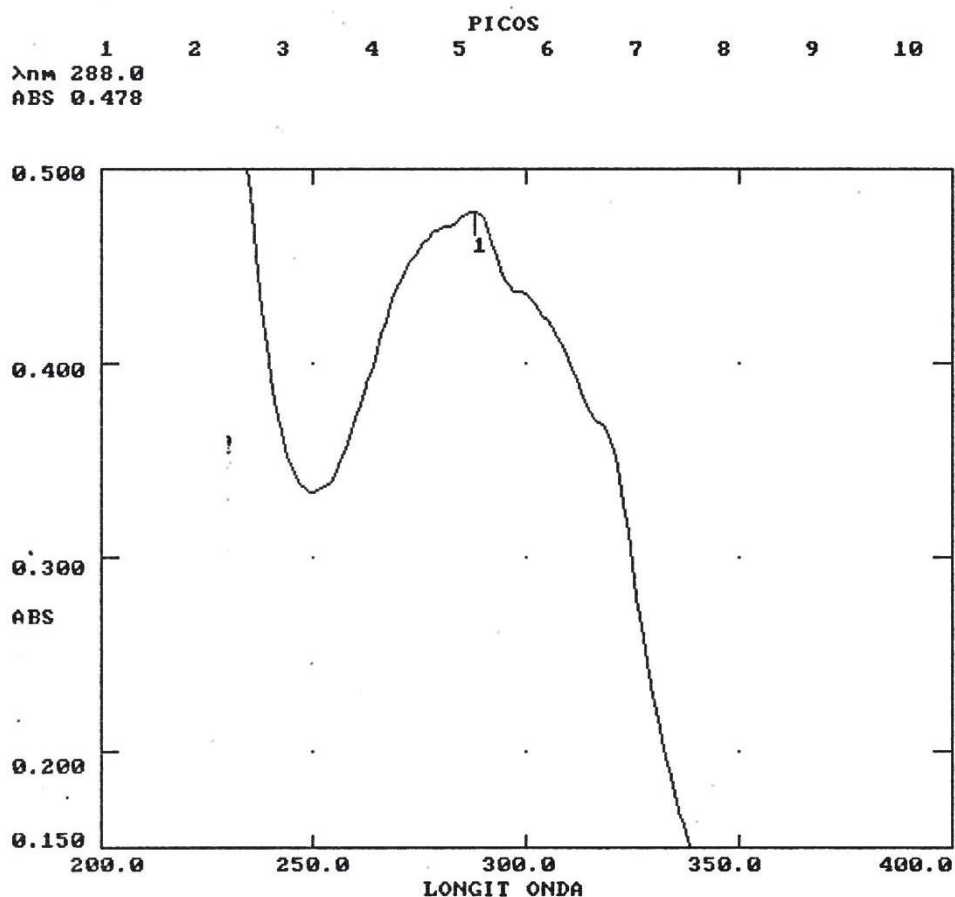
ANEXO 132. COMPUESTO 6

HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :

HORA :12:44:50 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO



ANEXO 143. COMPUESTO 7

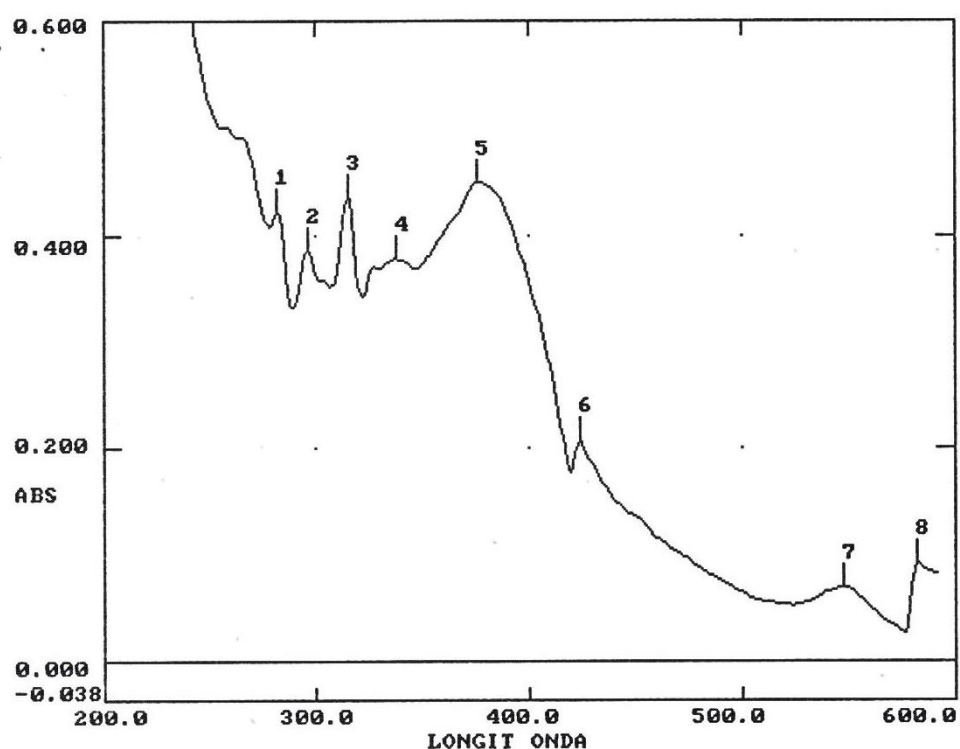
HELIOS[®] ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :13:06:08 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:DEFECTO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO

	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λnm	282.0	296.0	315.0	338.0	376.0	424.0	548.0	582.0		
ABS	0.422	0.387	0.437	0.377	0.449	0.206	0.069	0.092		



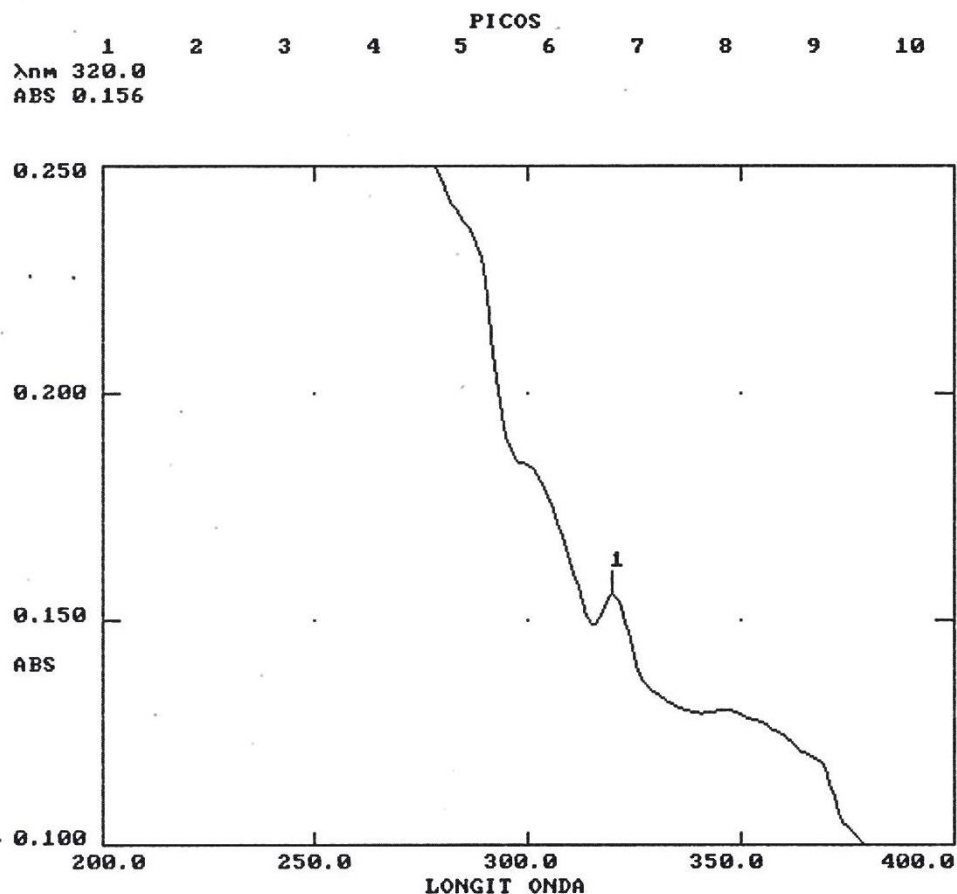
ANEXO 15. COMPUESTO 8

HELIOS β ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

PAGI. 1

FECHA:01/08/14 SERIE No:140113 ID :
HORA :12:54:54 OPERARIO :

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm
SUAVIZANDO: MEDIO



ANEXO 16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA-TUKEY. CITOPROTECCIÓN.

16/11/2014 10:00

Anova Un Factor

Número de Casos: 15

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	6.9170E10	4	1.7292E10	93.9713	0.0007E-4
Dentro Grupos	1.8402E9	10	1.8402E8		
Total (corr.)	7.1010E10	14			

16/11/2014 10:01

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

Número de Casos: 15

Método: LSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
CONTROL NEGATIVO	3	4000.0000	X
BLANCO	3	17000.0000	X
SUB METANOL	3	100000.0000	X
SUB ETereo	3	110000.0000	X
SUB ACETATO ETILO	3	190000.0000	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite
BLANCO VS CONTROL NEGATIVO	13000.0000	24679.089
BLANCO VS SUB ETereo	*-93000.0000	*24679.089
BLANCO VS SUB ACETATO ETILO	*-173000.0000	*24679.089
BLANCO VS SUB METANOL	*-83000.0000	*24679.089
CONTROL NEGATIVO VS SUB ETereo	*-106000.0000	*24679.089
CONTROL NEGATIVO VS SUB ACETATO ETILO	*-186000.0000	*24679.089
CONTROL NEGATIVO VS SUB METANOL	*-96000.0000	*24679.089
SUB ETereo VS SUB ACETATO ETILO	*-80000.0000	*24679.089
SUB ETereo VS SUB METANOL	10000.0000	24679.089
SUB ACETATO ETILO VS SUB METANOL	*90000.0000	*24679.089

* Diferencia estadísticamente significativa.

16/11/2014 10:02

Anova Un Factor, Homocedasticidad

Número de Casos: 15

Prueba C de Cochran: 0.4347 P-valor = 0.5105
Prueba de Bartlett: 12.5769 P-valor = 0.0135

**ANEXO 174. ANÁLISIS ESTADÍSTICO T-STUDENT PARA MUESTRAS DEPENDIENTES,
FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR**

16/11/2014 14:39

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de Sub-Extracto Acetato de Etilo por Marcador Fitoquímico

=====

Grupo	Sub-Extracto Acetato de Etilo	Marcador Fitoquímico
Tamaños Muestrales:	3	3
Medias Muestrales:	20.0500	11.6200
Desviaciones típicas:	1.8500	2.0900
E. E. de las Medias:	1.0681	1.2067

Varianza Conjunta: 3.8953
E. E. de la Diferencia de Medias: 1.6115
Grados de Libertad: 4.0000
Diferencia de Medias 8.4300

Estimación

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: 8.4300 +/- 4.4742 [3.9558, 12.9042]

t-Student

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000
Hipótesis Alternativa: no igual
t-Student: 5.2312
p-valor: 0.0064

Nota: Se asume igualdad de desviaciones típicas

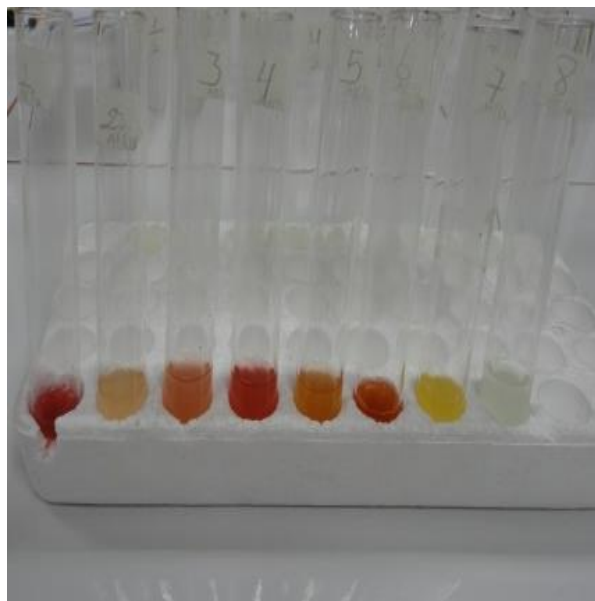
ANEXO 18. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA, TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.



FOTOGRAFÍA 2. SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS POR SOXHLET



FOTOGRAFÍA 3. EMBUDO DE SEPARACIÓN CON MUESTRA DE ACETATO DE ETILO



FOTOGRAFÍA 4. PRUEBA COLORIMÉTRICA DE SHINODA PARA FLAVONOIDES



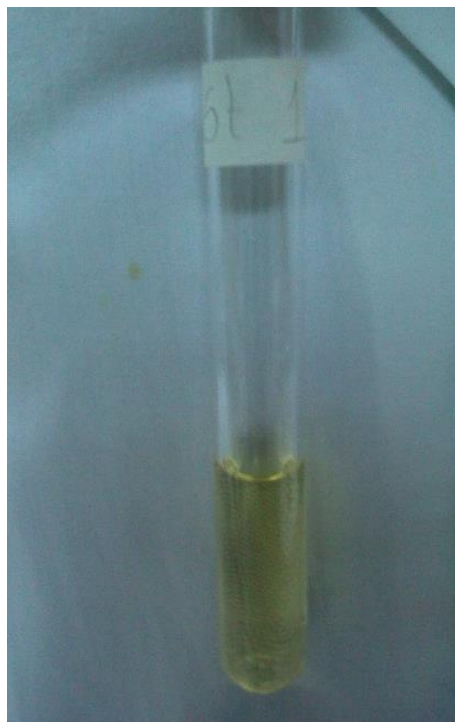
FOTOGRAFÍA 5.SUBEXTRACTO EN ACETATO DE ETILO



FOTOGRAFÍA 6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO INFRARROJO



FOTOGRAFÍA 7. EXTRACCIÓN DEL MARCADOR FITOQUÍMICO



FOTOGRAFÍA 8. MARCADOR FITOQUÍMICO FLAVÓNICO



FOTOGRAFÍA 9. ANÁLISIS ESPECTROSCOPÍA UV- VISIBLE



FOTOGRAFÍA 10. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



**FOTOGRAFÍA 11. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL EFECTO CITOFOTPROTECTOR
EN *E. coli***



FOTOGRAFÍA 12. PREPARACIÓN DE AGUA MAR PARA EL CÁLCULO DE LA TOXICIDAD EN *Artemia salina*



FOTOGRAFÍA 13. ECLOSIÓN DE *Artemia salina*